

Aus dem

Med. Zentrum für Augenheilkunde

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Kroll

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

Experimentelle bandförmige Keratopathie nach intrakameraler Injektion  
von Phosphatpufferlösung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Christoph Büning  
aus Hannover  
Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am: 21.09.2006.  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Lutz Hesse

Korreferent: Prof. Dr. med. Eberhard Weihe

Meinen Eltern in Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
0 Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Die Hornhaut – Anatomie und Physiologie	8
1.2 Hornhauttrübungen	12
1.3 Korneale Kalzifizierungen	15
1.3.1 „Calcareous Corneal Degeneration“	15
1.3.2 Kalzifizierende Bandkeratopathien	16
1.3.2.1 Chronische Bandkeratopathien	17
1.3.2.2 Akute Bandkeratopathien	17
1.4 Arbeitsintention und Arbeitshypothese	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Versuchstiere und Tierhaltung	21
2.2 Narkose	21
2.3 Operativer Eingriff	21
2.3.1 Behandlungsgruppen	21
2.3.2 Phosphatpuffer	23
2.3.3 Kalzium- und Phosphatbestimmung	23
2.3.4 Ansetzen der Injektionslösungen	23
2.3.5 Operationstechnik	24
2.4 Kontrollen	25
2.4.1 Untersuchungsintervalle	25
2.4.2 Anästhesie	25
2.4.3 Untersuchungsdurchführung	26
2.4.4 Trübungskategorien	26
2.5 Tötung der Versuchstiere	27
2.6 Enukeation der Bulbi und Weiterbehandlung der Hornhäute	27
2.7 Histologie	28
2.7.1 Einbettung der Hornhäute	28
2.7.2 Anfertigung der Paraffinschnitte	29
2.7.3 Färbung	29

2.7.3.1	Entplasten der Objektträger	29
2.7.3.2	Von Kossa - Färbung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Augen mit Endothelinzision (Gruppe A)	31
3.1.1	Phosphatbeladung der Vorderkammer 11,32 $\mu\text{mol}$ (n=3)	31
3.1.2	Phosphatbeladung der Vorderkammer 7,12 $\mu\text{mol}$ (n=3)	31
3.1.3	Phosphatbeladung der Vorderkammer 3,96 $\mu\text{mol}$ (n=3)	32
3.2	Augen ohne Endothelinzision (Gruppe B)	32
3.2.1	Phosphatbeladung der Vorderkammer 11,32 $\mu\text{mol}$ (n=3)	32
3.2.2	Phosphatbeladung der Vorderkammer 8,69 $\mu\text{mol}$ (n=2)	33
3.2.3	Phosphatbeladung der Vorderkammer 7,12 $\mu\text{mol}$ (n=3)	33
3.3	Kontrollgruppe (Gruppe C)	34
3.4	Tabellarische Ergebnisübersicht	35
3.4.1	Augen mit Endothelinzision (Gruppe A)	35
3.4.2	Augen ohne Endothelinzision (Gruppe B)	36
3.4.3	Kontrollgruppe (Gruppe C)	38
3.5	Histologie	38
3.6	Messwerte für Phosphat und Kalzium	40
4	Diskussion	41
4.1	Zur Ursache kalzifizierender Bandkeratopathien	41
4.2	Pathomechanismen bei kalzifizierenden Bandkeratopathien	42
4.2.1	Überschreitung des Löslichkeitsproduktes	42
4.2.2	Kalziphyllaxie	43
4.2.3	Verdunstung des Tränenfilms	44
4.2.4	Gefahr der Präzipitation durch Anstieg des pH-Wertes	45
4.2.5	Schrankenstörungen und Zellschäden	45
4.3	Die Bedeutung von Phosphat bei der Genese bandförmiger Keratopathien	47
4.4	Interpretation der eigenen Ergebnisse	50
4.5	Fazit	54
5	Zusammenfassung	56
6	Literaturverzeichnis	58
7	Abbildungen und Tabellen	68

8	Verzeichnis der akademischen Lehrer	70
9	Danksagung	71

## 0 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a.d.	an der
ad us. vet.	ad usum veterinarium
Art.	Artikel
AS	Augensalbe
AT	Augentropfen
ATP	Adenosintriphosphat
BSS	Balanced Salt Saline
c	Konzentration
C	Celsius
ca.	circa
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
Cl <sup>-</sup>	Chlor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dpt	Dioptrie
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
GA	Gauge
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
i.v.	intravenös
i.m.	intramuskulär
K	Gleichgewichtskonstante
K <sup>+</sup>	Kalium
kg	Kilogramm
Lp	Löslichkeitsprodukt
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmol	Millimol
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	nicht messbar
No.	number
Nr.	Nummer
OH <sup>-</sup>	Hydroxid
pH	potentia Hydrogenii
PO <sub>4</sub> <sup>---</sup>	Phosphat
r-TPA	recombinant tissue plasminogen activator rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator
s	Standardabweichung
stand.	Standard
UV	ultraviolett
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol



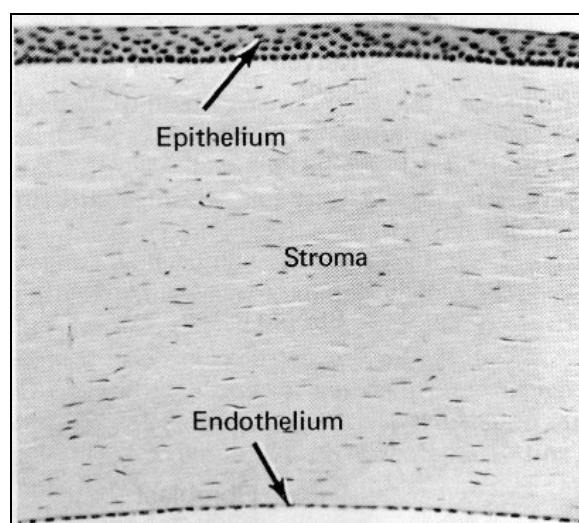
## 1 Einleitung

Das Auge ist wohl das Sinnesorgan, mit dem sich der Mensch am unmittelbarsten identifiziert. Mit keinem anderen Organ nehmen wir die Umwelt in einer solchen Vielfalt wahr (66).

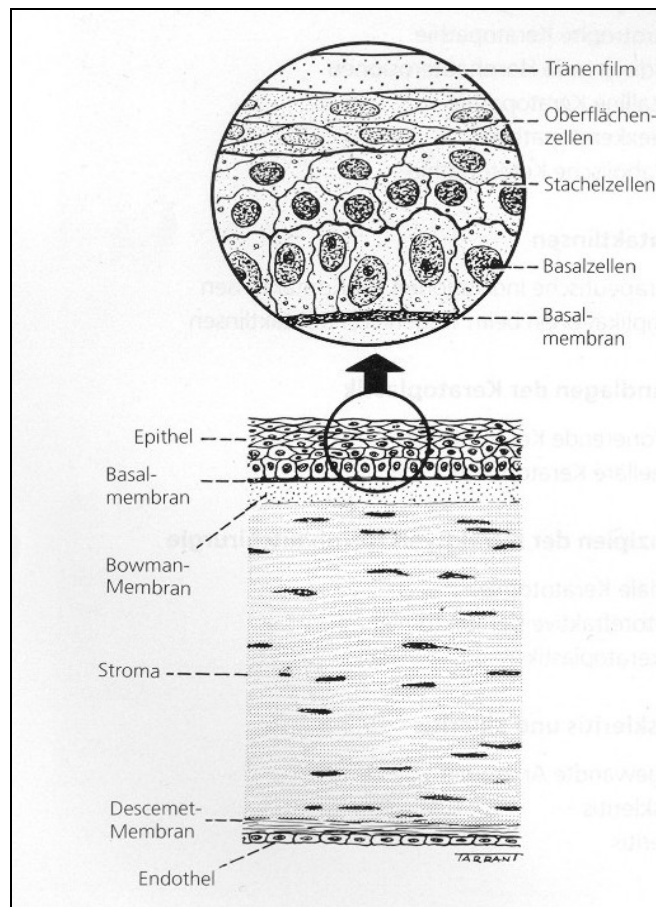
### 1.1 Die Hornhaut – Anatomie und Physiologie

Die Hornhaut (Kornea) ist das optische Fenster des Auges, welches dem Menschen das Sehen erst ermöglicht. Zusammen mit der undurchsichtigen Lederhaut (Sklera) bildet sie mit einem Anteil von einem Sechstel die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi). Die Hornhaut ist zentral wie ein Uhrglas mit einer seichten Randfurche (Limbus corneae) in die schwächer gekrümmte Sklera eingelassen (38).

Histologisch lassen sich an der Hornhaut fünf Lagen unterscheiden: Hornhautepithel als oberflächliche Schicht, gefolgt von Bowman-Membran, Hornhautstroma, Descemet-Membran und Endothelschicht. Entwicklungsgeschichtlich weisen die einzelnen Schichten unterschiedliche Ursprünge auf. Das Hornhautgewebe wird zusammen mit der Sklera im 2. Embryonalmonat angelegt. Während das Epithel aus dem Ektoderm hervorgeht, sind die unteren Hornhautschichten mesenchymaler Herkunft (38).



**Abb. 1.1** Mikrophotographie von einem Querschnitt durch die Kornea (Vergrößerung x 80)



**Abb. 1.2** Anatomie der Hornhaut

Die Oberfläche der Hornhaut wird von einem mehrschichtigen (5-6 Zellagen), unverhornten Plattenepithel gebildet. Das Epithel enthält drei verschiedene Zelltypen. Auf der epithelialen Basalmembran, die eng mit der darunter liegenden Bowman-Membran verwachsen ist, befindet sich eine einzelne Schicht aus zylindrischen, pallisadenartig angeordneten Basalzellen, die über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Es schließen sich 2-3 Zellagen Stachelzellen an, welche durch ihre stachelartigen Fortsätze charakterisiert sind. Die obersten beiden Zellschichten setzen sich aus dünnen Oberflächenzellen zusammen, die durch Interzellularbrücken miteinander verbunden sind. Zur Absorption von Schleim weisen sie Oberflächenvergrößerungen in Form von Mikrovilli und Mikrofalt auf, welche in den präkornealen Tränenfilm hineinragen. Die obersten Zellen schilfern nach einer Zeit von etwa zwei und einer Gesamtumsatzzeit von sieben Tagen in den Tränenfilm ab

(32). Als Zeichen der hohen Regenerationsfähigkeit des Hornhautepithels finden sich in den basalen Zellreihen zahlreiche Mitosen (31). Defekte, die auf das Epithel beschränkt bleiben, können zum Teil in Stundenfrist durch Zellverschiebung und Zellteilung kompensiert werden. Voraussetzung ist allerdings die Unversehrtheit der Stammzellen im Limbusbereich (38).

Die Bowman-Membran ist eng mit der Basalmembran des Hornhautepithels verwachsen. Sie besteht aus feinsten, sich wahllos kreuzenden Kollagenfibrillen und einer dichten Interzellularsubstanz und zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit aus (31). Der Mangel an zellulären Bestandteilen schließt jedoch eine aktive Regeneration bei einer Verletzung aus, so dass es lediglich zu einer Narbenheilung kommt (38).

Mit ca. 500  $\mu\text{m}$  macht das Hornhautstroma 90% der gesamten Hornhautdicke aus. An die Bowman-Membran schließen sich Lamellen paralleler Kollagenfaserbündel an, welche die ganze Länge der Kornea durchziehen und als Gesamtheit das Hornhautstroma bilden. Zwischen den Fasern finden sich vereinzelt Stromazellen. Des Weiteren findet sich amorphe Grundsubstanz, die sich aus sauren Keratoglykosaminoglykanen, überwiegend Keratansulfat und Chondroitinsulfat, zusammensetzt. Diese Bestandteile gewährleisten eine hohe Wasserbindungskapazität und dadurch einen entscheidenden Beitrag zur Transparenz der Hornhaut (32). Im kornealen Stroma existieren keine Blutgefäße. Daher besitzt es eine ausgesprochen niedrige Regenerationsfähigkeit (38).

Die Descemet-Membran ist eine echte Basalmembran und wird aus einem feinen Gitterwerk von dreidimensional angeordneten Kollagenfibrillen, die in eine Grundsubstanz eingebettet sind, gebildet (31). Die Bezeichnung „echte Basalmembran“ besagt, dass im Falle einer Schädigung der Descemet-Membran, eine narbenlose Heilung durch die angrenzende Endothelzellschicht erfolgen kann. Die Dicke der Descemet-Membran beträgt ungefähr 10  $\mu\text{m}$  und nimmt im Laufe des Lebens zu. Als relativ derbe Membran vermag sie die Vorderkammer selbst dann noch aufrecht zu

erhalten, wenn das Hornhautstroma zum Beispiel infolge einer Entzündung vollständig eingeschmolzen ist (38).

Die innerste Schicht der Hornhaut bilden hexagonale Zellen in Form eines einschichtigen Plattenepithels (32). Wichtigste Aufgabe der Endothelzellen ist die Regulierung des Quellungszustandes der Hornhaut und der damit verbundenen Gewährleistung der Transparenz. Die in den Endothelzellen lokalisierte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  stellt im Normalfall ein Gleichgewicht zwischen den Kräften der Hydratation (passiver Einstrom von Flüssigkeit) und Dehydratation (aktive Eliminierung von Flüssigkeit) der Hornhaut her (31). Die Endothelzellendichte beträgt beim Erwachsenen circa 2500 Zellen/ $\text{mm}^2$ . Endothelzellen sind nicht teilungsfähig. Im Falle einer Verletzung steht ihnen nur die Möglichkeit der Hypertrophie (Größenzunahme ohne Zellteilung) und der Migration zur Verfügung. Viele intraokulare Eingriffe gehen mit einem Verlust von Endothelzellen einher. Ab einer Endothelzellendichte von 300 Zellen/ $\text{mm}^2$  kann der passive Flüssikeitseinstrom in die Hornhaut nicht mehr kompensiert werden, was ein Ödem des Stromas und des Epithels mit konsekutiver Eintrübung der Hornhaut zur Folge hat (38).

Das fünfschichtige Hornhautgewebe ist zellarm, strukturlos und gefäßfrei. Ebenso wie Linse, Lederhaut und Glaskörper zählt es zu den bradytrophen Geweben; der Stoffwechsel ist bis auf die Epithelschicht träge. Diese Tatsache erklärt auch die langsame Heilung im Falle einer Verletzung. Die Ernährung mit nutritiven Metaboliten erfolgt durch Diffusion aus dem von Bindehautgefäßen am Limbus cornea gebildeten Randschlingennetz, sowie durch Stoff- und Ionenaustausch aus dem Tränenfilm und dem Kammerwasser. Der präkorneale Tränenfilm sichert zudem die glatte Oberfläche der Hornhaut und trägt so maßgeblich zur Hornhauttransparenz bei. Durch das bakterizide Ferment Lysozym wird das Auge vor Infektionen geschützt (38).

Die sensible Innervation der Hornhaut erfolgt aus zahlreichen Ästen des ersten Trigeminusastes (Nervus ophthalmicus). Nervenplexus liegen subepithelial und stromal. Bei Verletzungen des Hornhautgewebes kommt es häufig zur charakteristischen Trias

von Blepharospasmus (krampfhafter Lidschluss), Epiphora (Tränenfluss) und Schmerzen (38).

Beim Erwachsenen beträgt der mittlere Hornhautdurchmesser 11,5 mm (38), wobei der horizontale Durchmesser nicht selten etwas größer ist als der vertikale (55). Die zentrale Dicke der Hornhaut beträgt ca. 0,6 mm, in der Peripherie im Bereich des Limbus ungefähr 1,0 mm (55).

Der dioptrische Apparat des menschlichen Auges setzt sich aus Hornhaut, Linse und Glaskörper zusammen. Mit 43 Dioptrien (dpt) besitzt die Kornea den größten Anteil an der Gesamtbrechkraft des menschlichen Auges von 63 dpt (38).

Die Transparenz der Hornhaut ist für eine einwandfreie optische Funktion von entscheidender Bedeutung. Sie beruht zum einen auf der regelmäßigen Anordnung der Kollagenfibrillen im Hornhautstroma und der glatten faltenfreien Oberfläche von Epi- und Endothel, welche durch den intraokularen Druck hervorgerufen wird, zum anderen auf einem konstanten Wassergehalt des Hornhautstromas von 70%. Dieser wird sowohl durch die Barrierefunktion des Hornhautepithels als auch die aktive Pumpfunktion des Endothels gewährleistet (38).

## 1.2 Hornhauttrübungen

Jede Beeinträchtigung der Hornhauttransparenz kann im weitesten Sinn als Trübung bezeichnet werden. Es kann eine Unterteilung in eher zentral gelegene, visusbeeinträchtigende Trübungen und periphere, häufig ringförmige Veränderungen der Hornhaut erfolgen. Letztere gehen meist mit einer normalen Sehschärfe einher, da die zentralen Anteile der Hornhaut initial nicht betroffen sind. Als typisches Beispiel hierfür sind der Arcus senilis und der Kayser-Fleischer-Kornealring bei Morbus Wilson zu nennen. Differentialdiagnostisch kommen bei beiden Veränderungen zahlreiche Erkrankungen, sowohl primäre des Auges als auch Allgemeinerkrankungen mit okulärer Manifestation, sowie physiologische Altersveränderungen in Betracht. Mögliche Ursachen von Hornhauttrübungen sind in Tabellen 1.1 und 1.2 dargestellt.

**Tabelle 1.1** Hornhauttrübungen

### **Hornhauttrübungen**

- Hornhautödem (epithelial, stromal)
- Diffuse Keratitiden (epithelial, interstitiell)
- Striae
- Ausgedehnte Hornhautvernarbungen
- Hornhautdystrophien und -degenerationen
- Abstoßungsreaktionen
- Einlagerungen: Mukopolysaccharidosen  
Morbis Fabry  
Morbis Tangier  
Zystinose  
Späte infantile metachromatische Leukodystrophie  
Morbis Sandhoff  
Morbis Niemann-Pick  
Medikamententoxizität
- Trisomie 8, 9, 13, 18
- Trockene Augen
- Fetales Alkoholsyndrom
- Okulodermale und mukokutane Erkrankungen
- Kollagenosen
- Topische Medikamente
- Pannus
- Bandkeratopathien
- Sklerokornea
- Strahlenverletzungen
- Bluteinlagerungen
- Dermoid

**Tabelle 1.2** Ringförmige Veränderungen der peripheren Hornhaut

**Ringförmige Veränderungen der peripheren Hornhaut**

- Arcus senilis
- Arcus juvenilis
- Hinteres Embryotoxon
- Kayser-Fleischer-Ring
- Wesseley-Ring
- Ulkus Mooren
- Andere Ringulzera und Randinfiltrationen:
  - Akute Leukämie
  - Kollagenosen, rheumatoide Arthritis
  - Tuberkulose
  - Gonokokkenarthritis
  - Goldvergiftung
- Ringabszeß
- „String-Syndrom“
- Randdegeneration nach Terrien
- Randfurchenkeratitis, Dellen
- Akanthamöbenkeratitis
- Marginale Dystrophie
- Marginale Ulzeration

Mittels Spaltlampenuntersuchung lassen sich Hornhauttrübungen in Farbe, Form, Ausdehnung und Tiefenlokalisation beurteilen. Grundsätzlich können die zugrunde liegenden Veränderungen in jeder der fünf Schichten der Hornhaut auftreten. Dabei ist das Erscheinungsbild sehr unterschiedlich und reicht von diffusen Trübungen der gesamten Hornhaut bis zu fleckförmigen, scharf begrenzten Veränderungen. Auch in Farbe und vertikaler Ausdehnung bestehen erhebliche Unterschiede. Histopathologisch lassen sich zum Beispiel Pigmente, entzündliche Infiltrate, ödematöse Veränderungen, Kollagen- und Lipidansammlungen sowie kalkhaltige Ablagerungen nachweisen. Im

weiteren Verlauf dieser Arbeit soll im Besonderen auf kalzifizierende Keratopathien eingegangen werden.

### 1.3 Korneale Kalzifizierungen

Korneale Kalzifizierungen können sich gemäß der Lokalisation der Kalziumablagerungen im Hornhautgewebe im Wesentlichen auf zwei verschiedene Arten manifestieren.

#### 1.3.1 „Calcareous Corneal Degeneration“

Bei der eher seltenen „Calcareous Corneal Degeneration“ finden sich diese Ablagerungen im gesamten Hornhautstroma sowie in der Bowman-Membran und der Epithelschicht (33). Als Ursache dieser Form einer kalzifizierenden Keratopathie kommen die Phthisis bulbi, intraokulare Neoplasien, ausgeprägte Bulbustramata und andere Erkrankungen, bei denen eine Ossifikation in anderen Teilen des Bulbus entsteht, vor (3). Unter die Bezeichnung Trauma dürfte auch der von Duffey et al. beschriebene Fall einer Kalzifizierung nach Keratoplastik fallen (12). Seltener findet man eine „Calcareous Corneal Degeneration“ als Folge chronisch entzündlicher Augenerkrankungen und aufgrund von Störungen im Kalziumphosphatstoffwechsel (3). Ein Zusammenhang zwischen topisch angewandten Medikamenten und kalzifizierenden Degenerationen der Hornhaut im obigen Sinne wird postuliert (56). Häufig ist bei den Personen mit dieser Veränderung ein Epitheldefekt anamnestisch dokumentiert (6, 39, 56). In einigen dieser Fälle liegt histologisch sowohl eine „Calcareous Corneal Degeneration“ als auch eine bandförmige Keratopathie vor (39). Da sich die kalzifizierende Bandkeratopathie und die „Calcareous Corneal Degeneration“ fast ausschließlich durch das Ausmaß der Hornhautkalzifizierung unterscheiden lassen, geht man davon aus, dass es sich bei letzterer lediglich um ein fortgeschrittenes Stadium einer kalzifizierenden Bandkeratopathie handelt (33), bei der im Gegensatz zur „Calcareous Corneal Degeneration“ die tiefen Stromaanteile sowie die Epithelschicht von Kalziumablagerungen ausgespart bleiben.



### 1.3.2 Kalzifizierende Bandkeratopathien

Kalzifizierende Bandkeratopathien zeichnen sich durch kalziumhaltige Ablagerungen im Bereich der Bowman-Membran und den oberflächlichen Stromalamellen der Hornhaut aus. In einer Vielzahl der Fälle beginnen die interpalpebral lokalisierten Veränderungen peripher und dehnen sich allmählich bis auf die Hornhautmitte aus. Typisch ist ein klarer Streifen zwischen der Bandkeratopathie und dem Limbus, da an dieser Stelle Gefäße noch eine Pufferfunktion erfüllen können (49).

Duke-Elder et al. (13) teilen bandförmige Keratopathien in vier Kategorien ein. Am häufigsten werden sie bei Erkrankungen des Auges beobachtet. Veränderungen im Kalziummetabolismus werden einer weiteren Kategorie zugeteilt. Des Weiteren beschreiben die Autoren eine idiopathische und letztlich eine traumatische Form der kalzifizierenden bandförmigen Keratopathie.

Ergänzend zu dieser Einteilung berichten neuere Quellen auch über die Entstehung einer kalzifizierenden Keratopathie bei Gicht, discoidem Lupus erythematoses, Ichthyosis, tuberöser Sklerose, Rothmund-Thomson Syndrom, Parry-Romberg Syndrom und bei Exposition der Hornhaut mit bestimmten Stoffen wie Gasen oder topischen Medikamenten (3). Die Manifestation einer kalzifizierenden Bandkeratopathie erfolgt chronisch oder akut.



**Abb. 1.3** Bandförmige Keratopathie

#### 1.3.2.1 Chronische Bandkeratopathien

Bei dem überwiegenden Teil dieser Keratopathien steht ihre langfristige Entwicklung über Wochen und Monate im Vordergrund. So können sie bei chronisch intraokularen Reizzuständen wie der Uveitis im Rahmen der juvenilen Arthritis (3, 9, 26) und bei regelmäßiger Applikation bestimmter Augentropfen auftreten. Hier sind zum Beispiel steroidphosphat- (62, 63) und quecksilberhaltige Augentropfen (34) zu nennen. Auch bei chronischer Exposition des Auges mit Quecksilberdämpfen ist über Keratopathien dieser Art berichtet worden (22). Der Zusammenhang zwischen systemischen Veränderungen im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel des menschlichen Organismus und dem Auftreten von kornealen Kalzifizierungen ist schon seit langer Zeit bekannt (8). Erkrankungen, bei denen durch außerhalb der Norm liegende Serumwerte von Kalzium und/oder Phosphat ein Auftreten von bandförmigen Keratopathien beschrieben wird, sind Sarkoidose (46), multiples Myelom (70) und Hyperparathyreoidismus (23). Auch im Zuge einer chronischen Niereninsuffizienz kann diese Form der Hornhauttrübung auftreten (25, 36, 51).

#### 1.3.2.2 Akute Bandkeratopathien

Keratopathien, die sich innerhalb von wenigen Tagen manifestieren, werden bei trockenem Auge (41) und unter der Verwendung des Viskoelastikums Viscoat® (5, 7, 45, 68) gefunden.

Vor einigen Jahren wurde ebenfalls über eine sich bereits nach 24-48 Stunden manifestierende kalzifizierende bandförmige Keratopathie nach intrakameraler Gabe von r-TPA (recombinant tissue plasminogen activator) berichtet (1, 28, 43, 71). R-TPA wird zur intraokularen Lyse ansonsten therapierefraktärer Fibrinreaktionen sowie zur Behandlung von submakulären Blutungen verwendet (29, 37, 54, 57, 64, 67). Es ist ein gentechnisch hergestelltes Enzym, welches Plasminogen in Plasmin spaltet.

Wollensack et al. (71) und Althaus et al. (1) berichteten zuerst 1996 über das Auftreten von akuten bandförmigen Keratopathien bei jeweils zwei Patienten nach Behandlung einer postoperativen Fibrinreaktion mit r-TPA.

Wollensack et al. (71) machen für die aufgetretenen Krankheitsfälle die massive Freisetzung von Kalzium aus dem Fibringerinsel mitverantwortlich. Die Lokalisation der Kalziumablagerungen im Bereich der Bowman-Membran und den oberflächlichen Stromalamellen wird auf den dort herrschenden vergleichsweise höheren pH-Wert zurückgeführt. Außerdem könnten Kofaktoren, wie zum Beispiel Pseudoexfoliation, schlechte Benetzung der Hornhaut und andere Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus eine kontributive Rolle spielen.

Althaus et al. (1) folgern, dass nicht die intraokulare Anwendung von r-TPA allein, sondern erst die Kombination aus mehreren Risikofaktoren die bandförmige Keratopathie auslöst. Als Kofaktoren nennen sie Oberflächenproblematik, intraokulare Entzündungen und lokale Anwendung phosphathaltiger Augentropfen. Durch das Aufeinandertreffen dieser Faktoren kommt es zu einer Überschreitung des Löslichkeitsproduktes von Kalzium und Phosphat mit anschließender Ausfällung des Salzes in der Kornea.

Löffler et al. (42) halten für die Genese der kalzifizierenden Keratopathien weder die zur Verdünnung von r-TPA verwendeten Lösungen noch die Dosis des injizierten r-TPA für verantwortlich. Vielmehr sind diese auf systemische Voraussetzungen beziehungsweise eine individuelle Disposition des einzelnen Patienten zurückzuführen. Die Autoren empfehlen die prinzipielle Wirkung auf okuläres Gewebe und das Zusammenwirken mit endogenen oder auch präparatunabhängigen exogenen Faktoren zu untersuchen.

Hesse et al. (27) diskutieren als mögliche Ursache für die kalzifizierenden Erscheinungen nach r-TPA Injektion die verwendeten Pufferlösungen zur Verdünnung.

In einem Tiermodell untersuchen die Autoren Faktoren, die nach intrakameraler Injektion von TPA Bandkeratopathien entstehen lassen (28). Von entscheidender

Bedeutung scheint dabei die Existenz einer temporären Endothelstörung zu sein. Hesse et al. (28) zeigen anhand eines Kaninchen-Modells, dass bandförmige Keratopathien sowohl nach Phakoemulsifikation der Linse und anschließender intrakameraler Applikation von r-TPA, als auch nach Injektion von r-TPA in die Vorderkammer nach vorangegangener manueller Schädigung des Hornhautendothels auftreten. Histologisch finden sich Kalzifizierungen in der Bowman-Membran und den oberflächlichen Stromaanteilen. Keine Trübungen lassen sich an Augen nachweisen, bei denen r-TPA lediglich zur Lyse eines autologen Blutkoagels in der Vorderkammer verabreicht wird. Die Autoren vermuten, dass die Aufhebung der zellulären Integrität des Hornhautendothels zu einem Einstrom des stark phosphathaltigen Puffers, in dem r-TPA gelöst ist, in das Hornhautstroma führt. Zusätzlich strömt auch kalziumhaltige Vorderkammerflüssigkeit ein. Erst mit der Erholung der Endothelfunktion und der damit verbundenen aktiven Eliminierung von Wasser aus dem kornealen Stroma kommt es zu einer Ausfällung der unlöslichen Kalziumsalze durch Überschreitung des lokalen Löslichkeitsproduktes. Über die Tatsache, ob der Phosphatanteil des Puffers definitiv für die kalzifizierende bandförmige Keratopathie verantwortlich ist, kann noch keine endgültige Aussage getroffen werden. Allerdings legen Versuche aus der Vergangenheit diese Vermutung nahe. Damals wurde an einem Kaninchen-Modell gezeigt, dass durch die Reduzierung des Phosphatgehaltes des Viskoelastikums Viscoat<sup>®</sup> korneale Trübungen vermieden werden konnten (45).

#### 1.4 Arbeitsintention und Arbeitshypothese

In der vorliegenden Arbeit soll anhand eines Kaninchenmodells ein möglicher Zusammenhang zwischen der Phosphatkonzentration beziehungsweise Phosphatmenge in der Vorderkammer und dem Auftreten von kornealen Trübungen bei intakter und gestörter Endothelfunktion untersucht werden. Hierzu wurden die Vorderkammern der Versuchstiere mit unterschiedlichen Phosphatmengen beladen. An einigen Augen wurde zusätzlich eine Endothelläsion in Form von vier 1 mm messenden Endothelinzisionen vorgenommen. Als Kontrollen dienten Augen, welche lediglich oben erwähnte Endothelverletzung erhielten.

Die vorliegende Untersuchung dient der Überprüfung folgender Hypothesen:

1. Korneale Kalzifizierungen in Form von bandförmigen Keratopathien können am Tiermodell durch intrakamerale Injektion von phosphathaltiger Pufferlösung hervorgerufen werden.
2. Die entstehenden Trübungen sind abhängig von der Dosis des injizierten Phosphatpuffers.
3. Eine wesentliche Rolle bei der Genese der kalzifizierenden Keratopathien spielt eine Herabsetzung der strukturellen Integrität des Hornhautendothels.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Verwendet wurden Kaninchen (Wildtyp) mit einem Gewicht zwischen 1,5 kg und 4,5 kg, welche über die Behring-Werke Marburg bezogen wurden. Bezüglich des Geschlechtes und des Alters der Tiere wurden keine besonderen Anforderungen gestellt. Die Haltung erfolgte unter Aufsicht der Tierpflegestation Lahntal der Philipps-Universität Marburg in Metallgitterkäfigen und einem Tag-Nacht Rhythmus von 8 zu 16 Stunden unter einer Raumtemperatur von 20° Celsius. Die Nahrungszufuhr erfolgte durch Trockenfutter und Wasser ad libitum.

### **2.2 Narkose**

Der operative Eingriff wurde in einer kombinierten Allgemein- und Lokalanästhesie durchgeführt. Ein Gemisch aus 0,25 ml/kg Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer) und 0,25 ml/kg Ketavet® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Bayer) wurde intragluteal injiziert. Durch die anschließende Gabe von Cyclopentolat® 1% Augentropfen (Wirkstoff: Cyclopentolathydrochlorid, Alcon Thilo) wurde die für die Operation gewünschte Mydriasis erreicht. Die Oberflächenanalgesie der Hornhaut wurde durch Novesine® 0,4% Augentropfen (Wirkstoff: Oxybuprocainhydrochlorid, Ciba Vision) erzielt. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde Bupivacain-RPR® 0,5% CO<sub>2</sub> (Wirkstoff: Bupivacainhydrochlorid-Monohydrat, Rhone-Poulenc Rorer) subkonjunktival injiziert.

### **2.3 Operativer Eingriff**

#### **2.3.1 Behandlungsgruppen**

Aufgrund der im folgenden beschriebenen einzelnen Behandlungsmethoden wurden die Augen drei verschiedenen Gruppen (A, B und C) zugeordnet.

Bei Augen der Gruppe B wurde nach Entnahme von 250 µl Vorderkammerflüssigkeit eine äquivalente Menge einer Phosphatpufferlösung in die Vorderkammer injiziert. Tabelle 2.1 gibt Aufschluss über die im einzelnen verwendeten Konzentrationen des Phosphatpuffers und die absolute Menge in µmol von injiziertem Phosphat.

Augen der Gruppe A wurde zusätzlich eine Endothelläsion in Form von 4 circa 1,0 mm langen Ritzern zugefügt. Es wurde darauf geachtet, die Läsionen möglichst zentral in der Hornhautmitte anzulegen, um später die spaltlampenmikroskopische Beurteilung zu erleichtern.

Gruppe C, bestehend aus drei Augen, diente als Kontrollgruppe. Hier wurde lediglich eine operative Hornhautendothelinzision durchgeführt ohne zuvor Vorderkammerflüssigkeit zu entnehmen.

**Tabelle 2.1** Behandlungsgruppen

<b>Behandlungsgruppe A (Endothelinzision)</b>		
c[phosphat] der Injektionslösung in mmol/l	Phosphatmenge der Injektionslösung in µmol	Anzahl der behandelten Augen (n)
45,28	11,32	3
28,46	7,12	3
15,84	3,96	3
<b>Behandlungsgruppe B (keine Endothelinzision)</b>		
c[phosphat] der Injektionslösung in mmol/l	Phosphatmenge der Injektionslösung in µmol	Anzahl der behandelten Augen (n)
45,28	11,32	3
34,77	8,69	2
28,46	7,12	3

### 2.3.2 Phosphatpuffer

Der für die Injektionen verwendete Phosphatpuffer wurde in der Apotheke der Philipps-Universität Marburg angesetzt und besaß einen Phosphatgehalt von 129,4 mmol/l. Verdünnt wurde er je nach gewünschter Phosphatkonzentration mit Alcon BSS Plus<sup>®</sup> Teil 1.

### 2.3.3 Kalzium- und Phosphatbestimmung

Der Kalzium- und der Phosphatgehalt der verwendeten Lösungen und Medikamente wurde quantitativ durch Forb-Test mit Endpunktbestimmung mit dem Hitachi 917, Fa. Roche, bestimmt. Das Messgerät war für die Bestimmung der oben genannte Ionen in Heparinplasma geeicht.

Testprinzip für Kalzium: Kalzium und o-Kresolphthalein-Komplexon bilden in alkalischer Lösung einen Kalzium-o-Kresolphthalein Komplex. Die Farbintensität des gebildeten violetten Komplexes ist direkt proportional der Kalziumkonzentration und wird photometrisch gemessen.

Testprinzip für Phosphat: Anorganisches Phosphat bildet mit Ammoniummolybdat in schwefelsaurer Lösung einen Ammoniumphosphomolybdat-Komplex. Dieser Komplex wird photometrisch gemessen.

### 2.3.4 Ansetzen der Injektionslösungen

Zur intrakameralen Injektion wurde der unter 2.3.2 genannte Phosphatpuffer in unterschiedlichen Konzentrationen in die Vorderkammer injiziert. Die daraus resultierenden Phosphatkonzentrationen sowie die absolute Phosphatmenge der im einzelnen verwendeten Injektionslösungen sind unter Punkt 2.3.1 in Tabelle 2.1 aufgelistet. Diese Werte entsprechen nicht exakt der Division der Ausgangskonzentration des Phosphatpuffers durch den jeweiligen Verdünnungsfaktor, da der BSS-Puffer ebenfalls eine geringe Phosphatmenge enthielt, die rechnerisch



berücksichtigt werden musste. Um die jeweils benötigte Verdünnungsstufe anzusetzen, wurden 100 µl Phosphatpuffer in einer 1 ml Spritze (1 ml Plastipak<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Spain) mit der jeweils benötigten Menge an BSS-Puffer aufgezozen. Die Lösung wurde sorgfältig durchmischt und die Spritze bis auf einen Rest von 250 µl entleert.

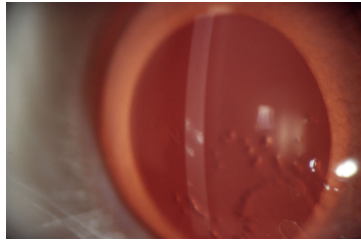
### 2.3.5 Operationstechnik

Mit einer auf eine 1 ml Spritze (1 ml Plastipak<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Spain) aufgeschobenen Kanüle (Microlance<sup>®</sup>3, 27GA  $\frac{3}{4}$  0,4x19 Nr.20, Becton Dickinson, Ireland) erfolgte der Zugang in die Vorderkammer unter mikroskopischer Sicht über eine kranial gesetzte Parazentese.

Bei Augen der Gruppe B wurden initial 250 µl Vorderkammerflüssigkeit aspiriert und anschließend eine äquivalente Menge an Phosphatpufferlösung injiziert. Hierbei wurde lediglich die Spritze ausgetauscht, die Kanüle (Microlance<sup>®</sup>3, 27GA  $\frac{3}{4}$  0,4x19 Nr.20, Becton Dickinson, Ireland) wurde in der Vorderkammer belassen, um eine weitere traumatische Schädigung der Hornhaut zu vermeiden.

Augen der Gruppe A wurden nach erfolgreicher Vorderkammerpunktion zunächst vier Endothelritzer zugefügt. Mit der Kanülenspitze (Microlance<sup>®</sup>3, 27GA  $\frac{3}{4}$  0,4x19 Nr.20, Becton Dickinson, Ireland) wurde das Hornhautendothel unter mikroskopischer Kontrolle an einer umschriebenen Stelle 4 mal über eine Länge von ca. 1 mm eingeritzt. Anschließend erfolgte ebenfalls die Aspiration von 250 µl Vorderkammerflüssigkeit und die Injektion von 250 µl Phosphatpufferlösung wie oben beschrieben.

Lediglich Endothelinzisionen erhielten die Augen aus Gruppe C.



**Abb 2.1** Endothelinzisionen

Die während der einzelnen Operationen entnommene Vorderkammerflüssigkeit wurde in 1 ml Eppendorf<sup>®</sup>-Pipetten gefüllt und bei  $-20^{\circ}$  C tiefgefroren. Am Ende der Versuchsreihe wurden die Proben wieder aufgetaut und es wurden Phosphat- und Kalziumkonzentration photometrisch, wie bereits unter 2.3.3 beschrieben, ermittelt.

Nach Beendigung der Operation wurde den Tieren Isopto-Max<sup>®</sup> Augensalbe (Wirkstoffe: Dexamethason, Neomycinsulfat, Polymyxin-B-Sulfat, Alcon Thilo) in den Konjunktivalsack verabreicht um eine postoperative Epithelschädigung durch Austrocknung zu verhindern.

## 2.4 Kontrollen

### 2.4.1 Untersuchungsintervalle

Es wurden jeweils am ersten postoperativen Tag und anschließend in wöchentlichen Abständen über einen Gesamtzeitraum von einem Monat Spaltlampenuntersuchungen in Mydriasis vom vorderen Augenabschnitt vorgenommen. Die Befunde wurden sowohl photographisch als auch schriftlich dokumentiert.

### 2.4.2 Anästhesie

Den Versuchstieren wurde vor der Untersuchung je 0,25 ml/kg Rompun<sup>®</sup> 2% (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer) und 0,25 ml/kg Valium<sup>®</sup> (Wirkstoff: Diazepam, Roche) intragluteal injiziert. Anschließend erfolgte die Gabe von Cyclopentolat<sup>®</sup> 1% Augentropfen (Wirkstoff: Cyclopentolathydrochlorid, Alcon Thilo).

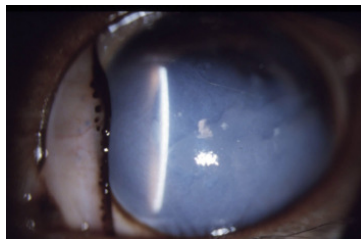
#### 2.4.3 Untersuchungsdurchführung

Die Tiere wurden mit einer Haag-Streit® - Spaltlampe mit angeschlossener Minolta® - Spiegelreflexkamera untersucht, die Hornhautveränderungen fotodokumentiert.

#### 2.4.4 Trübungskategorien

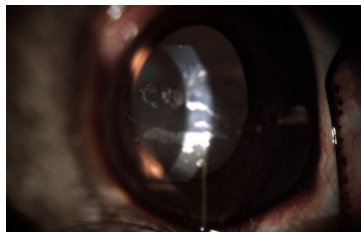
Um die Hornhauttrübungen später angemessen evaluieren zu können, wurden ihnen bestimmte Merkmale zugewiesen. Dabei konnten einer Hornhaut durchaus mehrere Merkmalseigenschaften zugewiesen werden.

Als überwiegend „diffuse Trübungen“ wurden milchige, unscharf begrenzte Veränderungen der Hornhäute bezeichnet. Anteile von scharf begrenzten, scholligen Trübungen konnten vorhanden sein.



**Abb 2.2** Überwiegend diffuse Trübung

Bei überwiegend „scholligen Trübungen“ imponierten die Veränderungen als scharf begrenzte, deutlich von der Umgebung abgrenzbare, weißliche Plaques, welche teils mit diffusen Trübungsanteilen durchsetzt sein konnten.



**Abb 2.3** Überwiegend schollige Trübung

Zur besseren Beschreibung der flächenmäßigen Ausdehnung der Trübungen erfolgte eine Einteilung ob mehr oder weniger als 50% der jeweiligen Hornhaut spaltlampenmikroskopisch von Trübungen betroffen war.

Befanden sich die Trübungen ausschließlich in der Lidspalte, wurde dies ebenfalls in der späteren Auswertung berücksichtigt.

Vaskularisationen der Hornhaut machten einen weiteren Punkt der Merkmalszuweisung aus.

## 2.5 Tötung der Versuchstiere

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere vorerst durch ein Gemisch von 0,25 ml/kg Rompun<sup>®</sup> 2% (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer) und 0,25 ml/kg Ketavet<sup>®</sup> (Wirkstoff: Ketavet, Bayer) i.m., wie bereits unter 2.2 beschrieben, narkotisiert und anschließend durch die Gabe von 0,5 ml T61<sup>®</sup> ad us. vet. (1 ml Injektionslösung enthält: 0,2 g Embutramid, 0,05 g Mebezoniumjodid und 0,005 g Tetracainhydrochlorid in wässriger Lösung) i.v. in eine Ohr randvene exzitationslos getötet.

## 2.6 Eukleation der Bulbi und Weiterbehandlung der Hornhäute

Die Eukleation der Augen wurde unter dem Operationsmikroskop durchgeführt. Initial erfolgte eine zirkuläre Eröffnung der Bindehaut. Anschließend wurden die Augenmuskeln dargestellt und vom Bulbus abgelöst. Der Sehnerv wurde dann mit der halb geöffneten Schere ertastet und durchtrennt.

Die Bulbi wurden in 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert und für einen Tag im Kühlschrank bei 5° Celsius aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Präparation der Hornhäute, die dann für einen weiteren Tag in der Formaldehydlösung unter Kühlung aufbewahrt wurden. Anschließend wurden sie mit einer Rasierklinge auf einer Korkunterlage in zwei gleich große Hälften geteilt. Es wurde darauf geachtet, dass

die Schnittfläche möglichst durch noch mit bloßem Auge erkennbare pathologische Befunde beziehungsweise durch Endothelinzisionen verlief, um die folgende histologische Aufarbeitung und anschließende Beurteilung zu vereinfachen.

## 2.7 Histologie

### 2.7.1 Einbettung der Hornhäute

Die Hornhauthälften wurden mit einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon Citadel 1000, Karrussell-Typ Gewebeeinbettautomat) entwässert und automatisch einparaffiniert. In der normalen Routine sind 10 Reagenzbehälter und zwei Wachsbäder vorgesehen, so dass insgesamt 12 Bäder während des Konservierungsprozesses durchlaufen werden. Folgende Tabelle gibt Aufschluss über die verwendete Reagenzien und die Verweildauer der Präparate in den einzelnen Kammern.

**Tabelle 2.2** Chemikalien in den einzelnen Kammern des Gewebeeinbettautomaten mit durchschnittlicher Verweildauer der Präparate

Kammer	Reagenz	Dauer
1	Alkohol 70%	0,25 h
2	Alkohol 80%	0,50 h
3	Alkohol 90%	0,50 h
4	Alkohol 90%	1,00 h
5	Alkohol 100%	1,00 h
6	Alkohol 100%	1,00 h
7	Alkohol 100%	1,00 h
8	n-Butylacetat	1,00 h
9	n-Butylacetat	1,00 h
10	n-Butylacetat	2,00 h
11	Paraffin	2,00 h
12	Paraffin	2,00 h
Gesamtdauer		13,25 h

Der vergällte 100%ige Alkohol wurde über die Apotheke der Philipps-Universität Marburg bezogen und mittels Aqua destillata (Aqua ad iniectabilia a Braun, Braun) auf die gewünschte Konzentration gebracht. N-Butylacetat stammte von der Firma Merck und als Paraffin wurde Vogel Histo-Comp<sup>®</sup> Gewebeeinbettmittel verwendet.

Nach Durchlaufen des Einbettungsprozesses erhielt man zwar schon in Paraffin befindliche Präparate, jedoch befanden sich diese lose angeordnet in Metallbehältern, die für das maschinelle Einbetten benötigt wurden. Die Hornhauthälften wurden deshalb durch Erwärmen entparaffiniert, um sie anschließend erneut, dieses Mal jedoch in schneidbare Blöcke, in Paraffin zu gießen.

### 2.7.2 Anfertigung der Paraffinschnitte

Von repräsentativen Blöcken wurden nun Schnitte auf manuellen Mikrotomen (Firma Reichert, Wien) angefertigt. Pro Block wurden aus 6 Ebenen jeweils 2 Schnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm gewonnen, wobei der Abstand zwischen den Ebenen 100 µm betrug. Als Ebene wurde der Bereich bezeichnet, in dem 2 direkt aufeinanderfolgende Schnitte gewonnen wurden. Danach wurde ein Bereich von 100 µm Dicke verworfen, bevor wieder 2 Schnitte in der nächsten Ebene angefertigt wurden. Mit dieser Methode gelang es, größere Bereiche des Präparates zu begutachten, ohne ein Übermaß an Schnitten anfertigen zu müssen.

Die erhaltenen Schnitte wurden auf Objektträger (Marienfeld No. 1000200) aufgezogen. Pro Ebene wurde ein Schnitt mit der von Kossa-Färbung gefärbt, der zweite Schnitt wurde als Reserve primär nicht weiter behandelt und asserviert.

### 2.7.3 Färbung

#### 2.7.3.1 Entplasten der Objektträger

Der Vorgang des Entplastens, das Entfernen des Paraffinwachses unter Belassung des zu untersuchenden Gewebes auf dem Objektträger, sei er hier kurz erläutert. Die Objekte durchliefen zuerst drei Bäder Xylol (Xylol, Riedel-de-Hain, Art. 33817),

anschließend eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%). Abschließend wurden die Objektträger mit Aqua destillata (Aqua ad iniectabilia a Braun, Braun) gespült.

#### 2.7.3.2 Von Kossa – Färbung

Die originale von Kossa-Färbung ist eine erstmalig von Romeis 1963 erwähnte Versilberung von Kalziumsalzen. Es ist eine indirekte Färbung, die mit den anionischen Bestandteilen der Kalziumverbindungen wie zum Beispiel Karbonaten und Phosphaten reagiert.

Zu Beginn des Färbevorgangs wurden verschiedene Lösungen angesetzt, und zwar Silbernitrat 5% (5 g Silbernitrat, Merck, Art. 1512 gelöst in 100 ml Aqua ad iniectabilia a Braun, Braun), Natriumthiosulfat 5% (Natriumthiosulfat-5-hydrat, Merck, Art. 6516) und Kernechtrot 0,1% [(5 g Aluminiumsulfat und 0,1 g Kernechtrot (Kernechtrot stand., Merck, Art. 5189) gelöst in 100 ml Aqua ad iniectabilia a Braun, Braun)]. Des Weiteren wurden im Verlauf der Färbung 96%iger vergällter Alkohol, Xylol (Xylol, Riedel-de-Hain, Art. 33817) und Permout® (Toluene solution, Fisher Chemical) zur Befestigung der Deckplättchen (Menzel-Gläser, 24x50mm #1) auf den Objektträgern (Marienfeld No. 1000200) benötigt.

Die Objekte wurden entplastet und 60 min. unter UV-Bestrahlung mit 5%iger Silbernitratlösung behandelt. Es folgte ein Spülvorgang mit Aqua destillata (Aqua ad iniectabilia a Braun, Braun). Nun wurden die Objekte für 3 min. in 5%ige Natriumthiosulfatlösung gelegt und anschließend erneut mit Aqua destillata gespült. Für 5 min. wurden sie dann mit Kernechtrotlösung 0,1% behandelt und wiederum mit Aqua destillata abgewaschen. Zum Abschluss der Färbung erfolgte ein Bad in 96%igem Alkohol mit anschließendem Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (3 Bäder Alkohol 100%, 2 Bäder Alkohol 96%) und Einschluss des Präparates über Xylol (Xylol, Riedel-de-Hain, Art. 33817) in Permout® (Toluene solution, Fisher Chemical).

In der von Kossa-Färbung stellen sich Kalziumsalze schwarz, Zellkerne rot und Zytoplasma hell rosa dar.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Augen mit Endothelinzision (Gruppe A)

##### 3.1.1 Phosphatbeladung der Vorderkammer 11,32 $\mu\text{mol}$ (n=3)

Am ersten postoperativen Tag wiesen alle Hornhäute eine diffuse, milchige Trübung im Sinne eines Hornhautödems mit Verdichtungen im Bereich der Endothelinzisionen auf. Der Einblick auf tiefer gelegene Strukturen des Auges war in zwei Fällen deutlich reduziert.

Nach einer Woche waren alle Hornhäute weiterhin diffus eingetrübt, eine Hornhaut vollkommen homogen, die anderen beiden mit weißlichen, scholligen Verdichtungen unterschiedlicher Intensität. Bei beiden dieser Hornhäute ließ sich eine vom Limbus ausgehende leichte Vaskularisation im nasal unteren Quadranten beobachten.

Nach zwei Wochen wies das erstgenannte Auge überwiegend auf die Lidspalte begrenzte schollige Trübungen mit diffusen Anteilen auf. Eine Hornhautvaskularisation ließ sich spaltlampenmikroskopisch nicht nachweisen. Im weiteren Verlauf trat keine weitere Änderung des Befundes ein.

Die übrigen beiden Hornhäute zeigten einander ähnliche Veränderungen. Sie zeigten ab der zweiten Woche weiterhin überwiegend diffuse Trübungen mit scholligen Verdichtungen in der Lidspalte. Hornhautvaskularisationen bestanden an beiden Augen, betont im nasal unteren Quadranten.

##### 3.1.2 Phosphatbeladung der Vorderkammer 7,12 $\mu\text{mol}$ (n=3)

Am ersten postoperativen Tag wiesen alle Hornhäute eine diffuse, milchige Trübung im Sinne eines Hornhautödems auf.



Nach einer Woche imponierten bei allen Hornhäuten im unmittelbaren Bereich der Inzisionen dichte umschriebene Trübungen. In zwei Fällen zeigten sich in der Hornhautperipherie vereinzelt homogene, leichte diffuse Trübungen über mehrere Uhrzeiten. Die dritte Hornhaut wies neben den verkalkten Endothelinzisionen eine überwiegend schollige, auf die Lidspalte begrenzte Trübung auf, welche sich im weiteren Beobachtungsverlauf nicht mehr veränderte.

Nach zwei Wochen waren die peripheren diffusen Trübungen der übrigen beiden Hornhäute deutlich rückläufig, bis zum Versuchsende jedoch noch vorhanden.

### 3.1.3 Phosphatbeladung der Vorderkammer 3,96 $\mu\text{mol}$ (n=3)

Nach einem Tag wiesen alle Hornhäute umschriebene milchige Trübungen im Bereich der Endothelinzisionen auf. Zusätzlich war bei einem Auge die obere Hälfte der Hornhaut im Sinne eines Hornhautödems diffus eingetrübt und bei einem weiteren bestand eine geringe diffuse Trübung peripher im nasal oberen Quadranten.

Nach einer Woche hatten sich die Trübungen komplett zurückgebildet. Die Endothelinzisionen waren gut abgrenzbar und spaltlampenmikroskopisch von denen der Kontrollgruppe nicht zu unterscheiden.

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes ergaben sich keine weiteren Veränderungen.

## 3.2 Augen ohne Endothelinzision (Gruppe B)

### 3.2.1 Phosphatbeladung der Vorderkammer 11,32 $\mu\text{mol}$ (n=3)

Diffuse Trübungen der gesamten Hornhaut im Sinne eines Hornhautödems prägten den ersten postoperativen Tag. Der Einblick auf tiefer gelegene Strukturen war deutlich reduziert.

Nach einer Woche wies ein Auge weiterhin eine überwiegend diffuse Trübung der gesamten Hornhaut auf. Nebenfundlich imponierte eine vom Limbus ausgehende Hornhautvaskularisation im oberen und unteren Bereich. Das zweite Auge wies eine überwiegend schollige Trübung mit diffusen Anteilen auf. Eine in der Lidspalte betonte, hauptsächlich schollige Trübung konnte bei dem dritten Auge spaltlampenmikroskopisch beobachtet werden.

Ab der zweiten Woche zeigten sich bis zum Versuchsende unveränderte Befunde. Eine Hornhaut wies eine überwiegend diffuse, teils schollige, lidspaltenbetonte Trübung der Hornhaut auf. Eine Hornhautvaskularisation bestand im nasal unteren Quadranten. Auf die Lidspalte begrenzte, überwiegend schollige Trübungen mit diffusen Anteilen prägten das Erscheinungsbild der beiden restlichen Hornhäute.

### 3.2.2 Phosphatbeladung der Vorderkammer 8,69 $\mu\text{mol}$ (n=2)

Am ersten postoperativen Tag war an beiden Augen ein diffuses Hornhautödem mit einer milchigen Trübung der gesamten Hornhaut nachweisbar.

Nach einer Woche zeigte sich in beiden Fällen eine lidspaltenbetonte überwiegend schollige Trübung mit diffusen Anteilen. Diese Erscheinungsform der Trübungen blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes bestehen. Eine Hornhautvaskularisation war nicht zu beobachten.

### 3.2.3 Phosphatbeladung der Vorderkammer 7,12 $\mu\text{mol}$ (n=3)

Alle drei Augen wiesen am ersten postoperativen Tag eine diffuse, milchige Trübung der gesamten Hornhaut im Sinne eines Hornhautödems auf.

Zwei Hornhäute waren bereits nach einer Woche spaltlampenmikroskopisch wieder völlig aufgeklärt, das dritte Auge entwickelte im weiteren Verlauf eine diffuse, teils schollige Trübung der gesamten Hornhaut. Diese Veränderung blieb im weiteren Versuchsablauf unverändert.

### 3.3 Kontrollgruppe (Gruppe C)

Am ersten postoperativen Tag zeigte sich bei allen Augen eine diffuse, umschriebene Hornhauttrübung im Bereich der Endothelinzision.

Nach einer Woche war diese Trübung in zwei Fällen nicht mehr vorhanden, während sie sich bei dem übrigen Auge vergrößert und auf die gesamte Lidspalte ausgedehnt hatte. Nach drei Wochen war diese Trübung ebenfalls nicht mehr existent. Alle Hornhäute waren klar, die Inzisionen gut zu erkennen.

### 3.4 Tabellarische Ergebnisübersicht

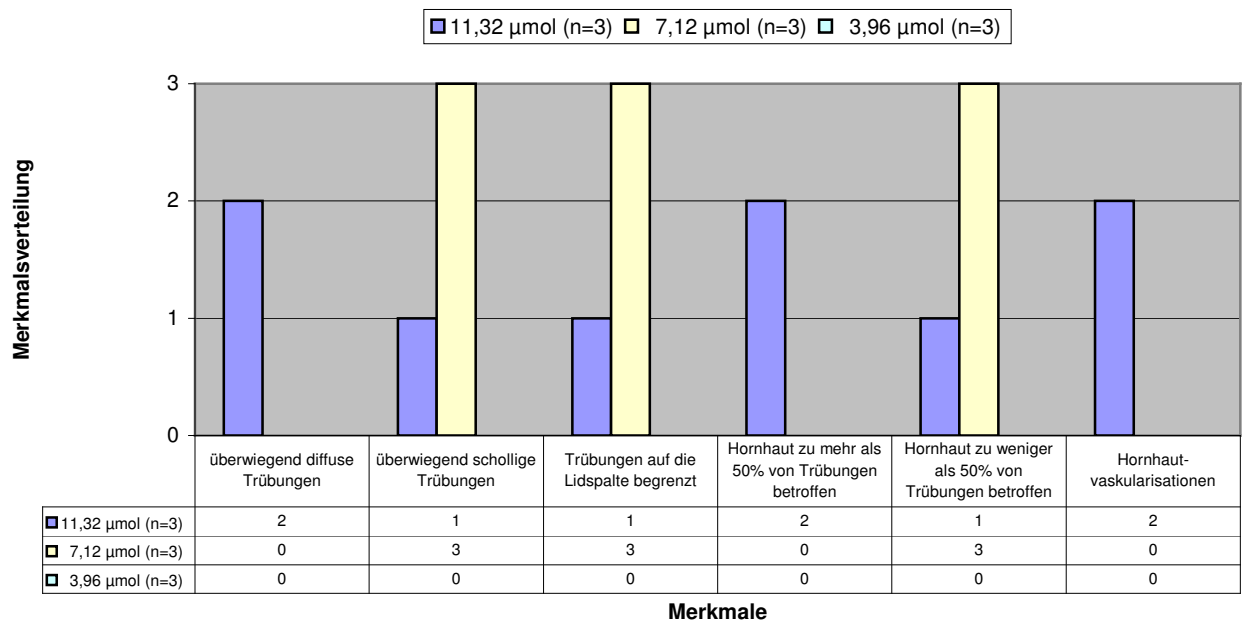
#### 3.4.1 Augen mit Endothelinzision (Gruppe A)

**Tabelle 3.1** Korneale Veränderungen bei Augen mit Endothelinzision nach 1 Monat

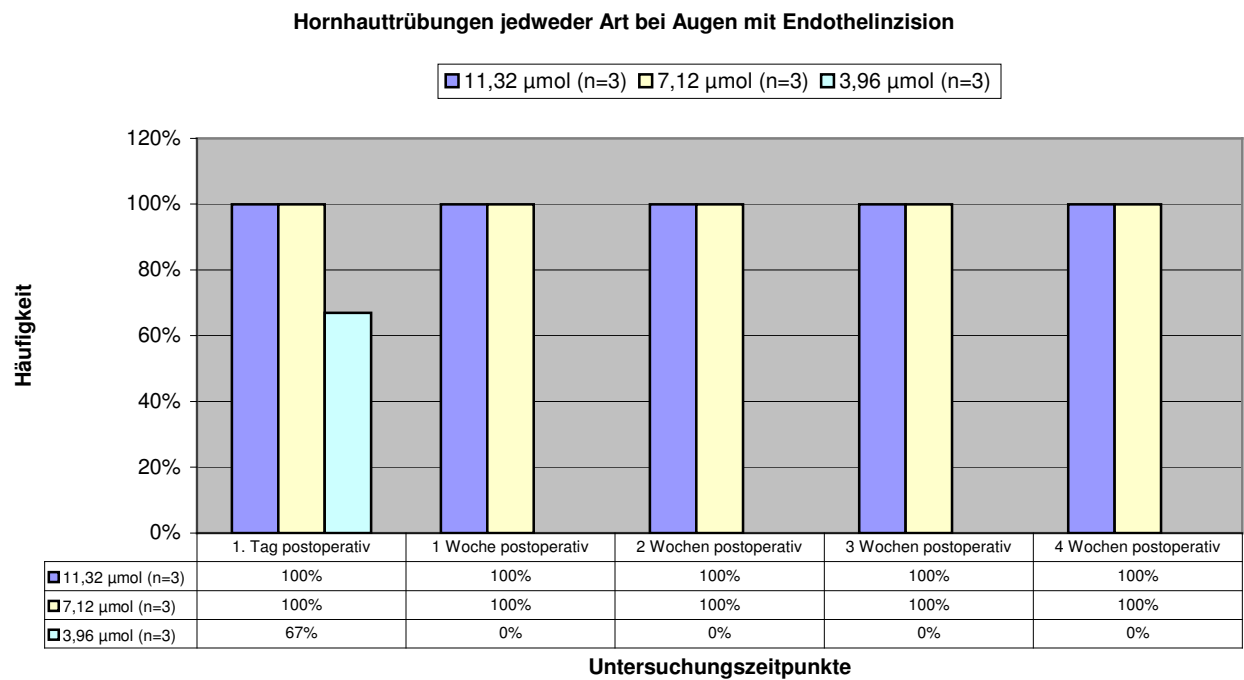
Phosphatbeladung der Vorderkammer in $\mu\text{mol}$	11,32 (n=3)	7,12 (n=3)	3,96 (n=3)
Endothelinzision	Ja	ja	ja
Verdünnungsmedium	BSS	BSS	BSS
Anzahl der Augen mit Trübungen jedweder Art	3	3	0
überwiegend diffuse Trübungen	2	-	-
überwiegend schollige Trübungen	1	3	-
Hornhaut zu mehr als 50% von Trübungen betroffen	2	-	-
Hornhaut zu weniger als 50% von Trübungen betroffen	1	3	-
Trübungen auf die Lidspalte begrenzt	1	3	-
Hornhautvaskularisationen	2	-	-

**Tabelle 3.2**

Übersicht der Hornhautveränderungen bei Augen mit Endothelinzision nach Ablauf eines Monats



**Tabelle 3.3**



### 3.4.2 Augen ohne Endothelinzision (Gruppe B)

**Tabelle 3.4** Korneale Veränderungen bei Augen ohne Endothelinzision nach 1 Monat

Phosphatbeladung der Vorderkammer in µmol	11,32 (n=3)	8,69 (n=2)	7,12 (n=3)
Endothelinzision	nein	nein	nein
Verdünnungsmedium	BSS	BSS	BSS
Anzahl der Augen mit Trübungen jedweder Art	3	2	1
überwiegend diffuse Trübungen	1	-	1
überwiegend schollige Trübungen	2	2	-
Hornhaut zu mehr als 50% von Trübungen betroffen	1	-	1
Hornhaut zu weniger als 50% von Trübungen betroffen	2	2	-
Trübungen auf die Lidspalte begrenzt	3	2	-
Hornhautvaskularisationen	1	-	-

Tabelle 3.5

Übersicht der Hornhautveränderungen bei Augen ohne Endothelinzision nach Ablauf eines Monats

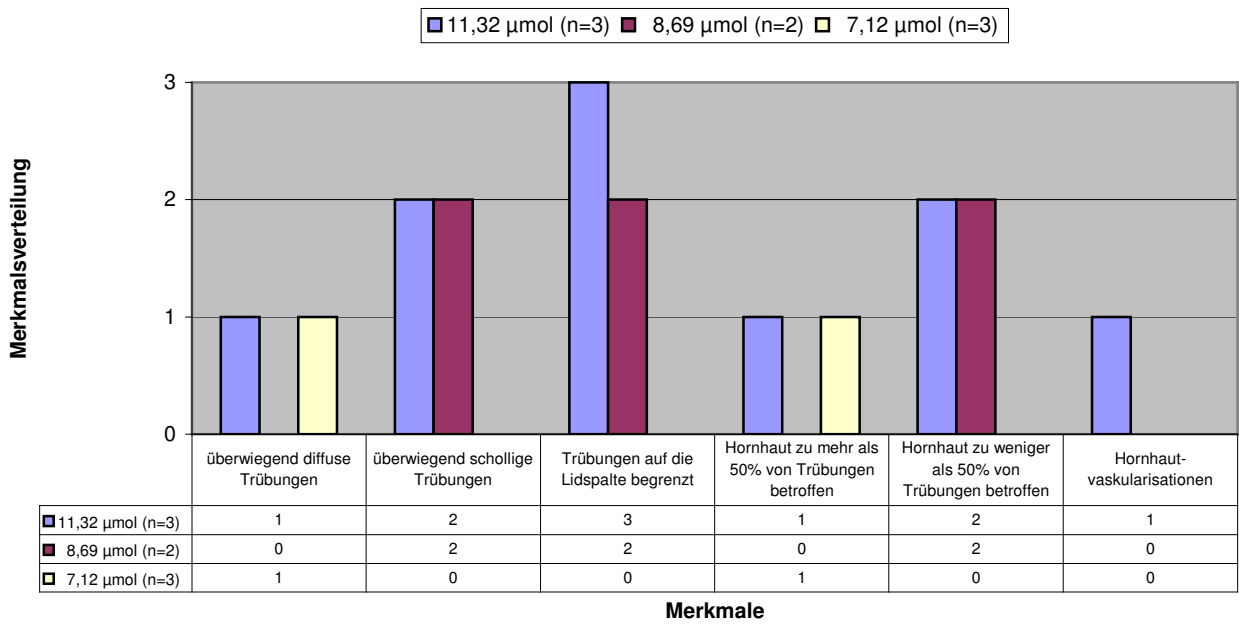
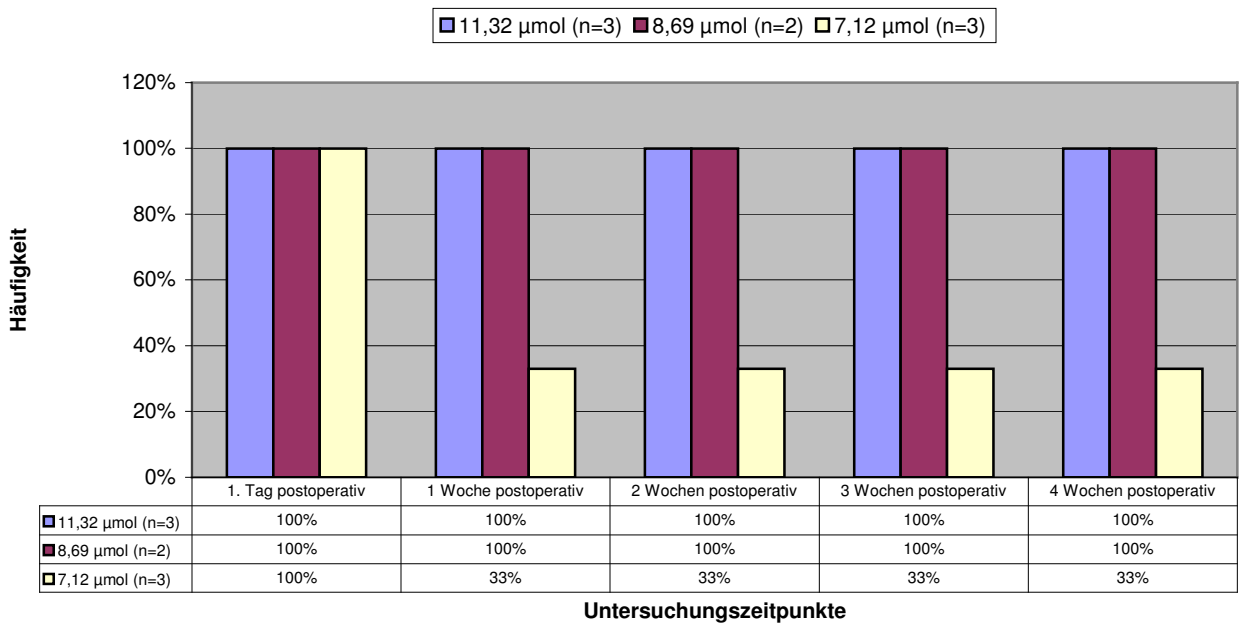


Tabelle 3.6

Hornhauttrübungen jedweder Art bei Augen ohne Endothelinzision



### 3.4.3 Kontrollgruppe (Gruppe C)

**Tabelle 3.7** Kontrollgruppe nach 1 Monat

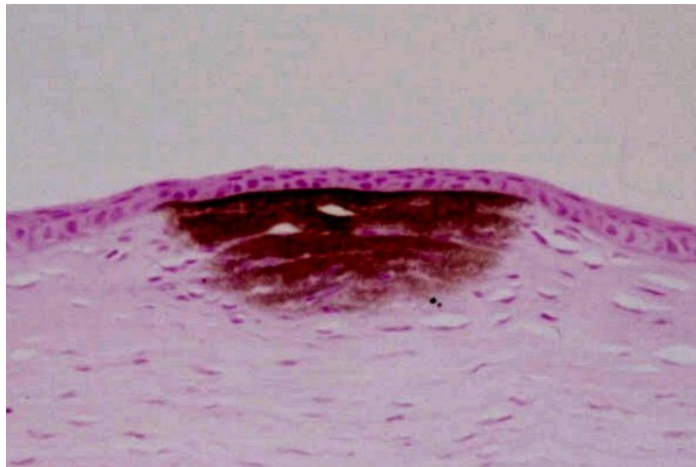
Phosphatbeladung der Vorderkammer in $\mu\text{mol}$	0 (n=3)
Endothelinzision	ja
Verdünnungsmedium	-
Anzahl der Augen mit Trübungen jedweder Art	0
überwiegend diffuse Trübungen	-
überwiegend Schollige Trübungen	-
Trübungen auf die Lidspalte begrenzt	-
Hornhautvaskularisationen	-

### 3.5 Histologie

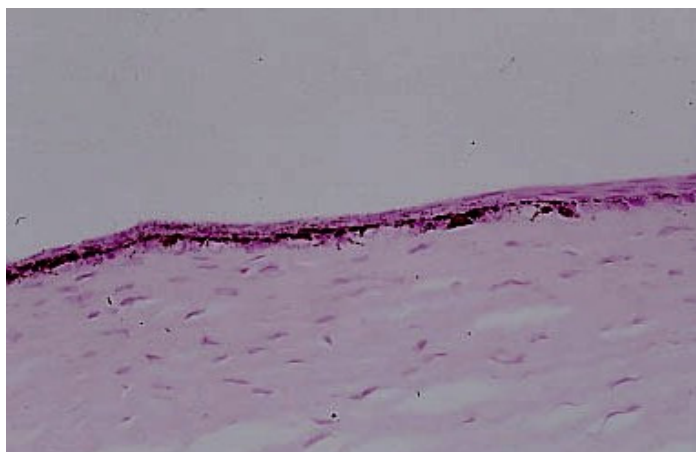
Die durchgeführte histologische Untersuchung an repräsentativen Hornhäuten diene in erster Linie dazu, die spaltlampenmikroskopisch erhobenen Befunde mit den histologischen Ergebnissen zu korrelieren. Die von Kossa-Färbung ist eine indirekte Nachweismethode für Kalzium, welches in Phosphaten und Carbonaten gegen Silberionen ausgetauscht wird. Durch Belichtung, im einfachsten Fall mit Tageslicht werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und stellen sich im Präparat dunkelbraun bis schwarz dar. Bei dieser Färbetechnik kann allerdings nicht zwischen Kalziumphosphaten und Kalziumcarbonaten unterschieden werden.

Histologisch begutachtet wurden nur Hornhäute, die auch spaltlampenmikroskopisch Anzeichen einer Hornhauttrübung aufwiesen. In diesen Fällen zeigten sich histologisch vergleichbare Veränderungen im Sinne einer positiven Anfärbbarkeit mit der von Kossa-Färbung. Die Präzipitation von Kalziumsalzen befand sich vor allem subepithelial und in den oberen bis mittleren Stromaanteilen.

Die folgenden Photographien sollen die histologisch erhobenen Befunde beispielhaft unterstreichen.



**Abb 3.1** Subepitheliale Kalzifizierung mit Beteiligung der oberen Stromalamellen  
(von Kossa-Färbung, Vergrößerung x 400)



**Abb 3.2** Epitheliale und subepitheliale Kalzifizierungen  
(von Kossa-Färbung, Vergrößerung x 200)



### 3.6 Messwerte für Phosphat und Kalzium

Der Gehalt an Phosphat und Kalzium im Kammerwasser wurde für jede Probe einzeln mit unter 2.3.3 erwähntem Verfahren bestimmt.

Außerdem wurden die verwendeten Medikamente sowie alle weiteren Lösungen, die mit den Augen in Kontakt kamen auf ihren Kalzium- und Phosphatgehalt hin überprüft. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der einzelnen Messwerte. Bei Mehrfachmessungen ist die Standardabweichung (s) in Klammern angegeben.

**Tabelle 3.8** Kalzium und Phosphatgehalt der verwendeten Medikamente im Vergleich zum Kammerwasser

Substanz	Phosphatgehalt in mmol/l	Kalziumgehalt in mmol/l
Kammerwasser	0,82 (s=0,14)	1,76 (s=0,21)
Novesine <sup>®</sup> 0,4% AT	nm	nm
Cyclopentolat <sup>®</sup> 1% AT	0,01	nm
Bupivacain-RPR <sup>®</sup> 0,5%	nm	nm
Isopto-Max <sup>®</sup> AS	nm	nm
Alcon BSS Plus <sup>®</sup> Teil 1	3,23 (s=0,015)	nm
Phosphatpuffer	129,4 (s=2,29)	nm

nm = nicht messbar

## 4 Diskussion

### 4.1 Zur Ursache kalzifizierender Keratopathien

Der weitaus größte Teil kalzifizierender bandförmiger Keratopathien entsteht in der Regel langsam über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten, so bei chronisch intraokularen Reizzuständen (11, 26, 33) und bei systemischen Veränderungen im Kalzium/Phosphat-Haushalt, wie sie zum Beispiel bei Hyperparathyreoidismus (23), Sarkoidose (24, 46), Multiplen Myelom (70) und chronischer Niereninsuffizienz (25, 36, 51) anzutreffen sind. Dabei scheint die grundlegende Ursache nicht unbedingt die Krankheit selbst, sondern die regelmäßig anzutreffende Hyperkalzämie und/oder Hyperphosphatämie zu sein. Eine Normalisierung der Serumwerte vermag in einigen Fällen ein Rückgang der Kalzifizierungen zu bewirken (17, 30). Die erhöhten Blutserumwerte für Phosphat und Kalzium korrelieren dabei nicht unbedingt mit dem Ausmaß der Kalzifizierung (61). Auch unter der Anwendung von quecksilberhaltigen Miotika (34) sowie bei chronischem Gebrauch von Augentropfen, welche einen Phosphatzusatz enthalten (52, 62, 63), werden bandförmige Keratopathien beobachtet. Seltener Ursachen sind die Orbicularisextirpation aufgrund eines essentiellen Blepharospasmus (65) sowie die Pars Plana Vitrektomie mit Silikonöltamponade (4, 40). In mehreren Versuchsreihen konnten tierexperimentell korneale Kalzifizierungen im Sinne einer Bandkeratopathie ausgelöst werden (11, 14, 15, 18, 28, 45, 47, 48, 69).

Akut auftretende kalzifizierende Bandkeratopathien werden bei Patienten mit trockenen Augen (21, 41) und nach Verwendung des Viskoelastikums Viscoat® im Rahmen eines operativen Eingriffes (5, 7, 45, 68) beobachtet.

Innerhalb der letzten Jahre haben mehrere Autoren eine sich innerhalb von 24-48 Stunden entwickelnde Keratopathie nach intrakameraler Injektion von r-TPA beschrieben (1, 43, 71). Dabei werden unterschiedliche Erklärungsversuche für die histologisch gesicherten bandförmigen Keratopathien abgegeben. R-TPA ist eine gentechnisch hergestellte Protease, die Plasminogen in Plasmin umwandelt, welches dann seinerseits Fibrin auflöst. Die Anwendung in der Augenheilkunde erfolgt vor

allem bei postoperativen, sonst therapierefraktären Fibrinreaktionen (29, 37, 54, 57, 67) sowie zur Behandlung von submakulären Blutungen (64).

Hesse et al. (28) verfolgten anhand eines Kaninchenmodells die These, wonach Bandkeratopathien durch massive Freisetzung von Kalzium nach intrakameraler Fibrinolyse mit r-TPA ausgelöst werden. Die Autoren kommen zu der Schlussfolgerung, dass korneale Kalzifizierungen nur dann auftreten, wenn zusätzlich zur intrakameralen Anwendung von r-TPA begleitend eine Verletzung des Hornhautendothels vorliegt.

In dieser Arbeit wurde der von Hesse et al. geäußerten Vermutung nachgegangen, wonach möglicherweise der stark phosphathaltige Puffer des r-TPA für die Hornhauttrübungen verantwortlich ist. Zudem wurde die Rolle einer gleichzeitigen Endothelstörung untersucht.

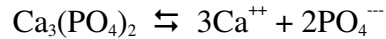
## 4.2 Pathomechanismen bei kalzifizierenden Bandkeratopathien

### 4.2.1 Überschreitung des Löslichkeitsproduktes

Über 99% der gesamten Kalziummenge liegt beim Menschen hauptsächlich in Form von Hydroxylapatit  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  im Knochen vor (16). Letzteres ist ein Komplex aus Kalzium und Phosphat sowie geringer Anteile anderer Ionen. Die auf Hydroxylapatit zutreffenden chemischen Gesetzmäßigkeiten, sei es im Knochen oder in anderen Geweben, hängen prinzipiell von der Löslichkeit von Kalziumphosphat  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  unter den jeweiligen Umgebungsbedingungen ab (49).

Zur quantitativen Erfassung der Löslichkeit von Salzen hat man das Löslichkeitsprodukt ( $L_p$ ) definiert. Eine gesättigte Salzlösung, die mit dem festen Bodenkörper des Salzes in Kontakt steht, ist ein typisches Beispiel für ein heterogenes Gleichgewicht. Das Produkt der Konzentrationen der gelösten Ionen ist bei gegebener Temperatur und pH-Wert eine Konstante und wird als Löslichkeitsprodukt bezeichnet. Bei Überschreitung des Löslichkeitsproduktes kommt es zur Ausfällung von Salzen (72).

Kalziumphosphat gehört in die Gruppe der schwer löslichen Salze. Vereinfacht lassen sich folgenden Reaktionsgleichungen für eine gesättigte Kalziumphosphatlösung aufstellen:



Die Gleichgewichtskonstante K für ein Gemisch aus komplexen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und seiner dissoziierten Ionen kann wie folgt abgeleitet werden:

$$K = \frac{[\text{Ca}^{++}]^3 [\text{PO}_4^{---}]^2}{[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]}$$

Im Falle eines heterogenen Gleichgewichts liegt festes Salz als Bodenkörper vor. Seine Konzentration bleibt in diesem Fall konstant und wird gleich 1 gesetzt. Somit ergibt sich für das Löslichkeitsprodukt folgende Gleichung:

$$L_p = [\text{Ca}^{++}]^3 [\text{PO}_4^{---}]^2$$

Zu einer Überschreitung des Löslichkeitsproduktes kann es bereits bei lokalen Konzentrationserhöhungen von Kalzium und/oder Phosphat sowie bei Temperaturänderungen und einem pH-Anstieg kommen. Folge ist eine Präzipitation von Kalziumphosphat (49).

#### 4.2.2 Kalziphylaxie

Doughman et al. (11) beschreiben ein Kaninchenmodell, bei dem nach Auslösen einer immunogenen Uveitis durch intrakamerale Injektion von Hühneralbumin und anschließender Cholecalciferol-Intoxikation (Vitamin D<sub>3</sub> – Intoxikation) in 100% der Fälle eine Bandkeratopathie auftritt. Ultraviolette Strahlung und Hyperkalzämie werden als mögliche Ursachen beziehungsweise Kofaktoren ausgeschlossen. Die Autoren erklären sich die in ihrem Versuch aufgetretenen Kalzifizierungen mit dem von Selye geprägten Begriff der Kalziphylaxie (60). Als Kalziphylaxie bezeichnet man eine biologische Reaktionsform, in deren Verlauf Gewebeverkalkungen entstehen. Sie wird im Tierversuch durch Einwirkung zweier pharmazeutischer oder mechanischer Reize innerhalb eines bestimmten Zeitabschnitts hervorgerufen. Ein Reiz ist eine mit dem

Kalziumstoffwechsel in Beziehung stehende Substanz (Sensitizer) und bewirkt eine Kalziummobilisierung, der andere Reiz (Challenger) löst die meist selektive Gewebeverkalkung aus (53). Als Sensitizer dient in vorliegendem Fall Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>), der Challenger ist die immunogene Uveitis. Die im Laufe der Versuchsreihe gemessenen Serumkalziumwerte stiegen unter Cholecalciferolgabe nicht über den Normalwert an, es fanden sich jedoch erhöhte Werte für Phosphat. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass bei Vorliegen einer immunogenen Uveitis und operativem Verschluss der Augenlider eine Cholecalciferol-Intoxikation keine kornealen Kalzifizierungen auslöst. Durch Kalziphylaxie ist dieses Phänomen nicht erklärbar, jedoch durch Phänomene, die durch die Verdunstung des kornealen Tränenfilms entstehen.

#### 4.2.3 Verdunstung des Tränenfilms

Die Tatsache, dass sich die Kalziumablagerungen vor allem in den oberflächlichen Stromalamellen nachweisen lassen, erklären Doughman et al. (11) durch die Folgen der Verdunstung des Tränenfilms von den exponierten, also interpalpebral gelegenen Anteilen der Hornhaut. Dadurch entsteht eine hauptsächlich subepitheliale Übersättigung der Hornhaut mit Kalzium und es kann bedingt durch lokale Faktoren zu einer Präzipitation von Kalziumsalzen kommen. Es wird gemutmaßt, dass die immunogene Uveitis eine Änderung des Hornhautstoffwechsels verursacht und den Gewebe pH-Wert möglicherweise in ein alkalisches Niveau verschiebt. Dies hat eine erleichterte Präzipitation von Salzen zur Folge.

Durch Lidschluss kehrt sich der ansonsten von der Vorderkammer Richtung Hornhaut gerichtete osmotische Gradient um und es entsteht ein Gefälle von der Hornhautvorderfläche zur Vorderkammer. Deshalb tritt in solchen Fällen keine Kalzifizierung auf.

Fabian et al. (15) beschreiben 1969 das Auftreten von kornealen Trübungen bei Ratten nach intramuskulärer Injektion hoher Dosen Morphinsulfates. Sie führen die irreversiblen, im Bereich der Bowman-Membran gelegenen Kalziumablagerungen auf Verdunstungserscheinungen der Hornhaut im Bereich der Lidspalte zurück, da durch

die Gabe von Morphinderivaten ein mehrstündiger Exophthalmus und damit assoziiert eine Austrocknung der Hornhaut resultiert.

#### 4.2.4 Gefahr der Präzipitation durch Anstieg des pH-Wertes

O'Connor et al. (49) modifizieren diese Theorie, indem Sie neben der Verdunstung des Tränenfilms und dem damit verbundenen Anstieg der Salzkonzentration in den oberflächlichen Stromaanteilen den Verlust von  $\text{CO}_2$  (Kohlendioxid) durch Diffusion betrachten. Bei allen exponierten Schleimhäuten ist ein diffusionsbedingter Verlust von  $\text{CO}_2$  zu beobachten mit konsekutiver Erhöhung des pH-Wertes im betroffenen Gewebe, bei der Hornhaut also im interpalpebralen Bereich. Dadurch erhöht sich die Gefahr zur Präzipitation von Kalziumsalzen, wie zum Beispiel von Kalziumphosphat, da das Löslichkeitsprodukt von Kalzium und Phosphat unter physiologischen Bedingungen bereits fast überschritten wird. Besteht eine Pufferkapazität durch angrenzende Blutgefäße, kann die pH-Änderung abgefangen werden. So ließe sich die perilimbale freie Zone bei einem großen Teil der kalzifizierenden Bandkeratopathien erklären.

Laut Kinoshita et al. (35) wird die Energieversorgung in den tieferen Stromaanteilen durch anaerobe Glykolyse gewährleistet. Durch den Anfall von Laktat herrscht dort ein etwas niedriger pH-Wert als in den oberflächlichen Stromalamellen und somit besteht dort ein geringeres Risiko für eine Ausfällung von Salzen.

#### 4.2.5 Schrankenstörungen und Zellschäden

Obenberger et al. (48) berichten über ein Tiermodell, bei dem nach oraler Gabe von hohen Dosen Dihydrotachysterol (Vitamin D – Derivat) in Zusammenhang mit auf unterschiedlicher Weise verursachter kornealer Verletzung, Kalzifizierungen beobachtet werden können. Folgende Verletzungsmechanismen werden erwähnt: Deepithelialisierung der ganzen oder der zentralen Anteile der Hornhaut, Abrasio der Hornhauthinterfläche, Vereisung, Permanganat-Injektion in die Vorderkammer und eine Kombination aus Abrasio und vollständiger Deepithelialisierung. Korneale Kalzifizierungen treten unter allen Verletzungsmechanismen in unterschiedlich starker

Ausprägung auf. Histologisch lassen sich vor allem subepitheliale Kalziumablagerungen nachweisen. Diese finden sich überwiegend in den Hornhautbereichen, wo sich verletzungsbedingt neue Fibroblasten gebildet haben. An Stellen wo diese fehlen, zeigen sich auch keine Kalziumablagerungen. Es wird spekuliert, dass unter anderem die von den Fibroblasten gebildeten Mukopolysaccharide mit ein Auslöser einer lokalen Kalzifizierung sind.

In einer weiteren Studie wird diese Theorie insofern modifiziert, dass saure Mukopolysaccharide wahrscheinlich lediglich als auslösender Faktor des Mineralisierungsprozesses in Frage kommen. (50)

Ein quantitativer Nachweis von sauren Mukopolysacchariden mittels histologischer Färbemethoden ist aufgrund der nicht mehr physiologischen Hydratation der Hornhäute zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung nicht gelungen (47).

Bei Patienten mit Hornhautulcera werden im Zusammenhang mit der Anwendung phosphathaltiger Augentropfen kalzifizierende Bandkeratopathien beobachtet (62, 63). Allerdings bestehen bei diesen Personen häufig noch weitere Risikofaktoren, wie trockene Augen und intraokulare Reizzustände.

1968 lösen Fine et al. (18) durch Laserbestrahlung der Kornea bei Kaninchen eine bandförmige Keratopathie aus. Histologisch finden sich Kalziumablagerungen im Bereich der Basalmembran, der Bowman-Membran und dem oberflächlichen Stroma. Die Autoren vermuten als Ursache der Keratopathie eine Kombination aus Trauma und Austrocknung.

Bloomfield et al. (6) beschreiben einen Fall einer sich akut entwickelnden bandförmigen Keratopathie bei einem Patienten mit chronischer Urämie und transienter Austrocknung der Hornhaut. Die damit verbundene Schädigung von Hornhautzellen könnte zu einer Freisetzung von Enzymen mit Pyrophosphatase-Aktivität geführt haben, die Pyrophosphate in anorganisches Phosphat hydrolysieren. Pyrophosphate kommen fast überall im Organismus vor, so auch in der Hornhaut. Durch das freigesetzte Phosphat kommt es zu einer Erhöhung des lokalen Löslichkeitsproduktes für Kalzium und Phosphat mit der Gefahr einer Kalzifizierung durch Präzipitation des Salzes.

Dark et al. (10) berichten über die Existenz von degenerativen Keratozyten bei einem Patienten mit atypischer bandförmiger Keratopathie. Als primäre Ursache für die auch histologisch nachgewiesenen Kalzifizierungen kann eine krankhafte Veränderung der Hornhautzellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Autoren vermuten eine Freisetzung von lysosomalen Enzymen, wie unter anderem Phosphatasen, die eine Erhöhung der lokalen Phosphatkonzentration bedingen und somit eine Präzipitation von Kalziumphosphat begünstigen.

Hesse et al. (28) beschreiben ein Tiermodell, bei dem eine Bandkeratopathie nach intrakameraler Injektion von r-TPA zur Lyse eines autologen Blutkoagels in der Vorderkammer nur dann auftritt, wenn gleichzeitig auch eine Endothelverletzung vorliegt. Aufgrund dieser Verletzung kommt es zu einem Hornhautödem durch Einstrom von phosphathaltiger Pufferlösung des r-TPA und kalziumhaltigen Kammerwasser. Nach Abheilung der Läsion wird Flüssigkeit aktiv aus der ödematösen Hornhaut gepumpt und es folgt eine Präzipitation von Kalziumphosphat durch Überschreitung des lokalen Löslichkeitsproduktes für dieses Salz.

#### 4.3 Die Bedeutung von Phosphat bei der Genese bandförmiger Keratopathien

Verkalkungen der Hornhaut auf dem Boden einer Störung des Kalzium/Phosphatstoffwechsels im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz sind lange bekannt (25, 51, 61). Allerdings werden häufiger korneale Kalzifizierungen beobachtet, wenn neben dem Kalzium auch gleichzeitig der Phosphatanteil im Serum erhöht ist (61). Korrelationen zum Ausmaß der Verkalkung ergeben sich jedoch erst dann, wenn in das Kalziumphosphatprodukt die alkalische Phosphatase mit einbezogen wird (25).

Phosphat ist in vielen Präparaten zur topischen aber auch intraokularen Anwendung in der Augenheilkunde verbreitet. Der in diesem Zusammenhang häufig verwendete Phosphatpuffer zeichnet sich dadurch aus, dass sein pH-Optimum bei 7,2 liegt, dieses Puffersystem demnach für alle Zellsysteme von Bedeutung ist (72).



Die Vermutung, dass Phosphat für Hornhauttrübungen in Form von kalzifizierenden Bandkeratopathien verantwortlich ist, wurde bereits vor einigen Jahren aufgestellt. Nach Kataraktoperationen mit dem Viskoelastikum Viscoat® (5, 7, 45, 68) wurden bei einigen Patienten kalzifizierende Keratopathien beobachtet. Kalziumablagerungen fanden sich in den oberflächlichen Stromaanteilen. In der damals handelsüblichen Zusammensetzung besaß Viscoat® einen Phosphatanteil von 93 mmol/l. Nevvas et al. (45) beschreiben ein Kaninchenmodell, bei dem durch Reduzierung des Phosphatanteils von 93 mmol/l auf 23 mmol/l korneale Trübungen gänzlich vermieden werden können. Bei der Verwendung von Viscoat® mit einem Phosphatanteil von 186 mmol/l treten Keratopathien in 10/13 Augen auf. Die Kalziumablagerungen sind bei den Kaninchenaugen in den oberflächlichen sowie in den tiefen Stromaanteilen lokalisiert. Da die Ablagerung bei der Verwendung von zittrathaltigen Spüllösungen (BSS) seltener auftreten als unter zitratfreien Spüllösungen (BSS-Plus), vermuten Ullman et al. (68), dass durch den Zitratanteil Kalzium gebunden werden kann, welches folglich nicht mehr für eine Bindung mit Phosphat zur Verfügung steht und somit die Präzipitation eines Kalziumphosphatkomplexes erschwert wird.

Sonstige prädisponierende Faktoren einer kalzifizierenden Keratopathie, wie zum Beispiel Schrankenstörungen im Sinne eines Epi- oder Endotheldefekts, trockene Augen oder akute intraokulare Reizzustände werden in diesem Zusammenhang nicht erwähnt.

Das Auftreten von bandförmigen Keratopathien und sonstigen Kalzifizierungen nach topischer (52, 56, 62, 63) und intrakameraler Phosphatanwendung (28) bei Vorliegen einer Schrankenstörung wird des Öfteren beschrieben.

Taravella et al. (63) berichten über korneale Kalzifizierungen bei 5 Patienten nach lokaler Anwendung von Augentropfen, die Steroidphosphate enthalten. Allerdings liegen in diesem Fall teilweise noch zusätzliche Gemeinsamkeiten vor, wie der Beigebrauch weiterer Augentropfen (n=5), Zustand nach Keratoplastik (n=3), Epitheldefekte (n=4), herpetische Keratitis (n=4) und Zustand nach Iritis (n=3). Eine alleinige Schädigung durch besagte Augentropfen ist somit nicht vollständig auszuschließen, vielmehr liegt wohl eher eine multikausale Krankheitsgenese vor. Es ist jedoch auffällig, dass auch bei den hier erwähnten Faktoren Schrankenstörungen und

intraokulare Entzündungen vorherrschen. Die Autoren folgern, dass ein Zusammentreffen dieser Ursachen mit der Anwendung der phosphathaltigen Augentropfen ein Überschreiten des Löslichkeitsproduktes für Kalziumphosphat bedingen mit konsekutiver Präzipitation dieses Salzes.

Über eine sich rapide, innerhalb von 72 Stunden manifestierende, beidseitige Bandkeratopathie nach Gabe von phosphathaltigen Augentropfen bei einer Patientin mit chronischer Keratoconjunctivitis sicca berichten Prasod et al. (52). Durch Applikation von Phosphat werde in dieser Situation das Löslichkeitsprodukt für Kalziumphosphat überschritten, mit den Folgen der Präzipitation.

Ebenfalls über korneale Kalzifizierungen nach Anwendung von Steroidphosphat enthaltenden Augentropfen berichten Schlötzer-Schrehardt et al. (56). Die Autoren ordnen die von ihnen beobachteten Veränderungen der „Calcareous Corneal Degeneration“ zu. In diesem Fall finden sich Kalziumablagerungen im gesamten Hornhautstroma, sowohl intra- als auch extrazellulär. Ein direkter Zusammenhang mit einer erhöhten Glykosaminoglykankonzentration in dem Bereich der Kalzifizierungen kann nachgewiesen werden. Diese Tatsache bestärkt die Vermutung der Autoren, dass metabolisch veränderte Keratozyten eine wichtige Rolle im Kalzifizierungsprozess spielen. Durch die Synthese von Substanzen wie zum Beispiel Glykosaminoglykanen, die in der Lage sind Kalziumphosphat zu binden, kann eine lokale Kalzifizierung ausgelöst werden. Der benötigte Phosphatanteil stammt im vorliegenden Fall aus den Augentropfen.

Schrage et al. weisen einen Zusammenhang zwischen kornealen Verkalkungen und der Spültherapie mit Phosphatpuffer nach (59). In einer doppelblinden Versuchsanordnung werden die Hornhäute von Kaninchen nach Verätzung mit 1 molarer Natronlauge (NaOH) über 30 s entweder mit isotoner Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%) oder mit einem kommerziell erhältlichen Phosphatpuffer 3 mal täglich mit 160 ml über einen Zeitraum von 16 Tagen gespült. Bereits nach zwei Tagen sind bei den mit Phosphatpuffer behandelten Augen Anzeichen einer Verkalkung zu erkennen und nach 16 Tagen weisen alle Versuchstiere eine Verkalkung der Hornhaut auf.

Nach Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%) kommt es vor allem zu einem Anstieg der subepithelialen Konzentration von Natrium und Chlor. Der Schwefelanteil der Hornhaut nimmt nach beiden Spülmethoden stark ab. Die Autoren vermuten eine Konditionierung des ungeschützten Hornhautstromas durch die jeweilige Spüllösung und fordern die Entwicklung einer dem kornealen Stroma angepassten Spülflüssigkeit und Verwendung eines organischen Puffersystems. Bereits in einer früher publizierten Arbeit beurteilen Schrage et al. Phosphatpuffer als eine unphysiologische Trägersubstanz für topische Medikamentenanwendung am Auge (58).

#### 4.4 Interpretation der eigenen Ergebnisse

In der von uns durchgeführten Versuchsreihe fanden sich korneale Kalzifizierungen nach intrakameraler Injektion von Phosphatpuffer unterschiedlicher Konzentration sowohl bei Augen an denen eine Endothelinzision vorgenommen wurde als auch an Augen mit mikroskopisch intakter Endothelschicht. Injiziert wurde immer eine Flüssigkeitsmenge von 250 µl. Daher ergaben sich bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen unterschiedliche absolute Mengen an injiziertem Phosphat. Diese werden im weiteren Verlauf bevorzugt anstelle der Phosphatkonzentration verwendet, da es sich um Mengenangaben hat, welche direkt miteinander vergleichbar sind.

Während der Versuchsphase wurden absteigende Phosphatmengen in die Vorderkammern der Versuchstiere injiziert. Es wurde versucht, in etwa die Phosphatmenge zu bestimmen, bei der Augen mit und Augen ohne Endothelinzision keine Trübungen mehr aufweisen.

Bis zu einer Phosphatbeladung der Vorderkammer von 8,69 µmol wiesen die Mehrheit der Augen mit als auch ohne Endothelschädigung korneale Trübungen auf.

Nach der Injektion von 7,12 µmol Phosphat war bei 2 von 3 Augen ohne Endothelschaden bereits nach einer Woche keine spaltlampenmikroskopisch sichtbare Hornhautveränderung mehr nachweisbar. Das dritte Auge dieser Behandlungsgruppe zeigte korneale Kalzifizierungen im Sinne einer bandförmigen Keratopathie.

Augen mit Endothelinzision imponierten nach der Applikation von 7,12  $\mu\text{mol}$  Phosphat mit deutlichen Kalzifizierungen im Bereich der Läsion und leichten diffusen Trübungen in der Peripherie bei ansonsten klarer Hornhaut.

Nach der Injektion von 3,96  $\mu\text{mol}$  Phosphat in die Vorderkammer konnten bei Augen mit operativer Endothelverletzung keine Trübungen mehr nachgewiesen werden.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass korneale Kalzifizierungen sowohl an Augen mit als auch ohne Endothelinzision nach Injektion einer bestimmten Phosphatmenge in die Vorkammer entstehen. Dabei ist die Menge an Phosphat, die benötigt wird, um eine Kalzifizierung auszulösen, bei mechanisch geschädigter Endothelschicht etwas niedriger. In unserer Versuchsreihe dürften die Grenzwerte für Augen ohne Endothelinzision bei etwas unter 7,12  $\mu\text{mol}$  Phosphat liegen, die für Augen mit Endothelläsion etwas über 3,96  $\mu\text{mol}$  Phosphat.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Nevyas et al. (45) gestützt. Die Autoren weisen in Ihrem Kaninchenmodell nach intrakameraler Injektion des Viskoelastikums Viscoat® mit einer Phosphatkonzentration von 23 mmol/l bei keinem von 10 behandelten Augen korneale Kalzifizierungen nach. Injiziert wurden immer 0,25 ml Flüssigkeit. Es wurde keine Endothelverletzung vorgenommen. Rechnerisch ergibt dies bei besagter Phosphatkonzentration von 23 mmol/l eine Phosphatbeladung der Vorderkammer von 5,75  $\mu\text{mol}$ . In dieser Größenordnung besteht somit keine Gefahr einer bandförmigen Keratopathie bei intakter Endothelschicht.

Von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz ist die zelluläre Integrität von Epithel und Endothel. Weitere Faktoren, wie eine normale biochemische Zusammensetzung der Grundsubstanz, der aktive Transport von Elektrolyten, Stoffwechselprodukten und Flüssigkeit in anterioposteriorer Richtung und hinlänglich zelluläre Energiereserven sind ebenfalls zu berücksichtigen. Wird die zelluläre Integrität von Epi- oder Endothel durch dystrophische, inflammatorische, traumatische oder mechanische Reize aufgehoben, so entsteht fast immer ein Hornhautödem durch Einstrom von Flüssigkeit in die verletzte Hornhaut. Bei Endothelläsionen ist das entstehende Ödem in der Regel gravierender. Somit scheint dem Endothel eine bedeutendere Rolle bei der Aufrechterhaltung der

Hornhauttransparenz zuzukommen als dem Epithel (20). Gestützt wird diese Aussage dadurch, dass das Endothel über aktive, ATP-abhängige Ionenpumpen den Flüssigkeits- und Elektrolytbestand des Hornhautstromas zu einem großen Teil reguliert (38).

Der Zusammenhang zwischen kornealen Kalzifizierungen nach Phosphatbeladung der Vorderkammer bei Augen an denen eine Endothelläsion vorgenommen wurde, lässt sich mit der von Hesse et al. (28) aufgestellten Theorie erklären. Durch die Störung der Endothelschranke kommt es zu einem Einstrom von versuchsbedingt phosphathaltiger Vorderkammerflüssigkeit in das Hornhautstroma. Da das Kammerwasser unter physiologischen Bedingungen auch Kalziumionen enthält, strömen diese ebenfalls durch den Endotheldefekt in die Hornhaut ein. Kann nun im Folgenden das Hornhautendothel den Schaden kompensieren, so wird durch die aktive Pumpfunktion des Endothels Wasser aus der Hornhaut in die Vorderkammer befördert und der Wassergehalt der Hornhaut sinkt. Durch die relative Dehydratation des Stromas erfolgt eine Präzipitation von Kalziumphosphat durch Überschreitung des lokalen Löslichkeitsproduktes. In beschränktem Ausmaß ist das Endothel fähig, Defekte von sich aus, mittels Hypertrophie der einzelnen Endothelzelle, zu decken. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichend hohe Endothelzelldichte. Durch interindividuelle Unterschiede dieser Größe lassen sich zum Teil abweichende Beobachtungen erklären.

Hesse et al. (28) beobachten in Ihrem Kaninchenmodell keine kornealen Veränderungen an Augen ohne Endothelläsion nach intrakameraler Lyse eines autologen Blutkoagels durch r-TPA. Die Autoren injizierten den Versuchstieren 25 µg TPA (Fibrisol®, 0,1 mg/ml, Basotherm, Biberach a. d. Riß) in die Vorderkammer. Die Phosphatkonzentration von Fibrisol® wurde photometrisch mittels Molybdatreaktion und der Kalziumgehalt flammenphotometrisch bestimmt. In injizierbarem Zustand ergaben sich Konzentrationen von 114,6 mmol/l Phosphat beziehungsweise 0,19 mmol/l Kalzium. In absoluten Mengen ergäbe dies bei der von den Autoren verabreichten TPA-Menge eine Phosphatmenge von 28,65 µmol und eine Kalziummenge von 0,0475 µmol. Im Gegensatz hierzu finden sich in vorliegender Versuchsreihe bei Augen, an denen kein willkürlicher Endothelschaden verursacht wurde, korneale Trübungen nach Phosphatbeladung der Vorderkammer bis zu einem gewissen Grenzwert. Dieser beläuft

sich auf etwas unter 7,12  $\mu\text{mol}$  Phosphat. Neben der Endothelläsion müssen folglich im Rahmen dieses Versuchsaufbaus noch weitere Faktoren bei der Genese von kalzifizierenden Bandkeratopathien eine Rolle gespielt haben.

Denkbar wäre eine unbeabsichtigte Endothelverletzung während der Entnahme des Kammerwassers oder während der Injektion der Phosphatpufferlösung an Augen, die eigentlich keine Läsion erhalten sollten. Um diese Möglichkeit weitgehend zu eliminieren, wurde die Parazentese sehr nah am Limbus angesetzt und beim Wechsel zwischen Flüssigkeitsentnahme und Injektion lediglich die Spritzen ausgetauscht. Die Kanüle wurde unter Fixation im Stichkanal belassen. Auch sonst wurden vom Operateur keine akzidentiellen Endothelverletzungen, wie etwa durch Luxation der Kanülenspitze, beobachtet. Eine unbeabsichtigte Endothelläsion kann auch insofern ausgeschlossen werden, da bis zu einer bestimmten Phosphatbeladung bis auf wenige Ausnahmen mit großer Konstanz korneale Kalzifizierungen auftraten.

Möglicherweise ist dem von uns verwendeten Phosphatpuffer eine direkt endotheltoxische Wirkung zuzuschreiben. Ein Indiz hierfür könnten die gerade bei höheren Phosphatmengen zu beobachtenden Hornhautvaskularisationen sein.

Berücksichtigt man die Tatsache, dass die Kammerwasserproduktion des Ziliarkörpers pro Minute circa 1  $\mu\text{l}$  bis 6  $\mu\text{l}$  beträgt und dass Vorder- und Hinterkammer ein durchschnittliches Gesamtflüssigkeitsvolumen von in etwa 200  $\mu\text{l}$  bis 400  $\mu\text{l}$  enthalten, so werden in einer Minute ungefähr 1-2% der Kammerwassermenge ersetzt. In ein bis zwei Stunden wird somit der Kammerinhalt erneuert (44). Dies führt zu einem Verdünnungseffekt der injizierten Phosphatmenge, so dass es bereits nach einigen Stunden zu einer Normalisierung der Phosphatkonzentration kommt. Die womöglich resultierende bandförmige Keratopathie muss folglich auf Vorgänge während dieser Frist zurückzuführen sein. Eine Endotheldekompensation aufgrund umschriebener oder diffuser Schädigung müsste sich also auch innerhalb dieser Zeit manifestieren, wodurch derselbe Effekt wie durch eine mechanische Endothelläsion zu tragen kommt. Die Endothelzelldicke wurde allerdings nicht bestimmt, so dass über diese Vermutung keine genauere Aussage getroffen werden kann.

Neben einer toxischen Komponente könnten jedoch auch physiologische Transportvorgänge am Endothel für die beobachteten Veränderungen verantwortlich sein. Wie bereits erwähnt kommt dem Endothel eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des Flüssigkeitsgehaltes der Hornhaut zu. Hierbei spielen aktive und passive Transportvorgänge eine wichtige Rolle. Man unterscheidet weiterhin zwischen zellulären und parazellulären Transportmechanismen. Beteiligt an der Regulierung des kornealen Elektrolythaushaltes sind unter anderem eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  - ATPase, ein  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  - Austauscher, ein  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  - Symport, ein  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$  - Austauscher, ein  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  - Symport und  $\text{K}^+$ - sowie weitere Anionenkanäle (19). Entscheidend für die Elektrolytzusammensetzung der extrazellulären Matrix ist die Integrität der Grenzschichten der Hornhaut (55).

Die osmotische Permeabilität des endothelialen Gewebes darf ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Normalerweise findet sich in einer gesunden Hornhaut sehr wenig Phosphat (58). Wird die Vorderkammer mit diesem Anion beladen, wird einerseits ein osmotischer Gradienten vom Stroma Richtung Vorderkammer aufgebaut, andererseits besteht ein Anionengefälle in Richtung Stroma, so dass man durchaus einen passiven Einstrom von Phosphationen vermuten könnte. Ob die in vorliegender Versuchsreihe beobachteten Bandkeratopathien bei Augen, an denen keine Endothelläsion vorgenommen wurde auf „physiologische“ oder toxische Wirkungen zurückzuführen sind, kann hier nicht definitiv beantwortet werden.

#### 4.5 Fazit

In vorliegender Arbeit lässt sich ein Zusammenhang zwischen einer Phosphatbeladung der Vorderkammer und dem Auftreten kornealer Kalzifizierungen herstellen. Die Kalzifizierungen wurden biomikroskopisch und histologisch nachgewiesen und zeigten bei höheren Phosphatmengen das Bild einer bandförmigen Keratopathie. Dabei ist nicht nur eine Verletzung des Endothels und somit eine Verletzung der zellulären Integrität dieser für die Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz wichtigen Schranke von Bedeutung, sondern es müssen auch andere Möglichkeiten für die Genese der hier beobachteten Keratopathien in Betracht gezogen werden, da sie auch an Augen ohne

sichtbare Endothelläsion auftreten. Denkbar wären hier toxische oder aber auch physiologische Aspekte. Bei Hornhäuten mit einer Endothelschädigung scheinen Trübungen bereits bei etwas niedrigeren Phosphatmengen zu entstehen als an Augen, an denen keine Endothelinzision vorgenommen wurde.



## 5 Zusammenfassung

Kalzifizierende Bandkeratopathien zeichnen sich durch eine Ablagerung von Kalziumsalzen in der Bowman-Membran und den oberflächlichen Stromalamellen der Hornhaut aus. Ätiopathogenetisch kommen verschiedene auslösende Faktoren in Betracht. Neben primären Erkrankungen des Auges und Systemerkrankungen, die Veränderungen im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel bewirken, spielt auch die intraokulare sowie topische Anwendung von phosphathaltigen Präparaten eine Rolle.

R-TPA (rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator) ist ein gentechnisch hergestelltes Enzym, welches Plasminogen in Plasmin spaltet und sowohl zur Lyse ansonsten therapierefraktärer Fibrinreaktionen in der Vorderkammer, als auch zur Behandlung von submakulären Blutungen in der Ophthalmologie Verwendung findet. Im Zusammenhang mit der Anwendung von r-TPA ist vereinzelt über das Auftreten von kalzifizierenden Bandkeratopathien berichtet worden. Ob für die Genese dieser Art von Keratopathie r-TPA als Einzelstoff oder eventuell auch die als Solvens verwendete stark phosphathaltige Pufferlösung verantwortlich ist, konnte bis jetzt nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden.

In vorliegender Arbeit sollte der Hypothese nachgegangen werden, inwiefern eine Phosphatbelastung der Vorderkammer eine Kalzifizierung der Hornhaut hervorrufen kann und welche Bedeutung dabei der zellulären Integrität des Hornhautendothels zukommt.

In einem Kaninchenmodell wurden die Vorderkammern der Versuchstiere mit absteigenden Konzentrationen einer handelsüblichen Phosphatpufferlösung und somit unterschiedlichen absoluten Phosphatmengen beladen. Um mögliche Einflüsse einer gleichzeitig bestehenden Schrankenstörung auf die Genese einer bandförmigen Keratopathie zu untersuchen, wurde das Endothel in einer zweiten Versuchsgruppe vor der Phosphatbelastung mechanisch mit einer Kanülenspitze auf definierte Weise verletzt. Kontrolltiere erhielten lediglich eben erwähnte Endothelinzision. Kontrollen erfolgten jeweils am ersten postoperativen Tag sowie in wöchentlichen Abständen

mittels Spaltlampenuntersuchung in medikamentöser Mydriasis. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes erfolgte die exzitationslose Tötung der Versuchstiere und eine Enukleation der Bulbi. Der Nachweis von Kalziumsalzen erfolgte durch die von Kossa-Färbung an repräsentativen Hornhautdünnschnittschnitten.

Sowohl bei Hornhäuten mit als auch bei Hornhäuten ohne Endothelinzision konnten dabei Kalzifizierungen nachgewiesen werden. Diese traten überwiegend subepithelial und in den oberflächlichen Stromalamellen auf. Bei der in vorliegender Arbeit durchgeführten Versuchsreihe zeigte sich, dass Hornhäute mit einer mechanischen Endothelschädigung nach Beladung der Vorderkammer mit Phosphat bereits bei etwas niedrigeren Mengen Kalzifizierungen entwickelten als Augen ohne Endothelläsion.

Korneale Kalzifizierungen im Sinne von Bandkeratopathien lassen sich durch intrakamerale Injektion von phosphathaltigem Puffer auslösen. Dabei ist eine Schrankenstörung im Sinne einer operativ vorgenommenen Endothelinzision nicht zwingend erforderlich. Lediglich scheint bei vorgeschädigtem Endothel die Phosphatmenge, die benötigt wird um eine Kalzifizierung hervorzurufen, geringer zu sein als an Augen mit intakter Endothelschicht.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Althaus C, Schelle C, Sundmacher R (1996)**  
*Akute bandförmige Keratopathie nach intraokularer Fibrinolyse mit rekombinantem Tissue-Plasminogen-Aktivator (rt-PA).*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 209:318-321
2. **Augustin AJ**  
*Augenheilkunde*  
2. Auflage, Springer 2001;846-847
3. **Arffa RC, Grayson M**  
*Diseases of the cornea*  
3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Mosby year book 1991;346-349
4. **Beekhuis WH, van Rij G, Zivojnovic R (1985)**  
*Silicone oil keratopathy: indications for keratoplasty.*  
Br J Ophthalmol 69:247-253
5. **Binder PS, Deg JK, Kohl FS (1987)**  
*Calcific band keratopathy after intraocular chondroitin sulfate.*  
Arch Ophthalmol 105:1243-1247
6. **Bloomfield SE, David DS, Rubin AL (1978)**  
*Acute corneal calcification.*  
Ann Ophthalmol 10:355-360
7. **Coffman MR, Mann PM (1986)**  
*Corneal subepithelial deposits after use of sodium chondroitin.*  
Am J Ophthalmol 102:279-280

8. **Cogan DG, Albright F, Barter FC (1948)**  
*Hypercalcemia and band keratopathy.*  
Arch Ophthalmol 40:624-638
9. **Cunningham ET (2000)**  
*Uveitis in children.*  
Ocul Immunol Inflamm 8:251-261
10. **Dark AJ, Proctor J (1982)**  
*Atypical band-shaped calcific keratopathy with keratopathy changes.*  
Br J Ophthalmol 66:309-316
11. **Doughman DJ, Olson GA, Nolan S, Hajny RG (1969)**  
*Experimental band keratopathy.*  
Arch Ophthalmol 81:264-271
12. **Duffey RJ, LoCascio JA 3d (1987)**  
*Calcium deposition in a corneal graft.*  
Cornea 6:212-215
13. **Duke-Elder S, Leigh S**  
*System of Ophthalmology*  
Vol. 8, pt2. Diseases of the outer eye  
London: Henry Kimpton 1965;770
14. **Economon JW, Silverstein AM, Zimmerman LE (1963)**  
*Band keratopathy in a rabbit colony.*  
Invest Ophthalmol 31:361-368
15. **Fabian RJ, Bond JM, Drobeck HP (1967)**  
*Induced corneal opacities in the rat.*  
Br J Ophthalmol 51:124-129

16. **Fanconi G (1962)**  
*Physiology and pathology of calcium metabolism.*  
Advances Ped. 12:307
17. **Feist RM, Tessler H, Chandler JW (1992)**  
*Transient calcific band-shaped keratopathy associated with increased serum calcium.*  
Am J Ophthalmol 113:459-461
18. **Fine BS, Berkow JW, Fine S (1968)**  
*Corneal calcification.*  
Science 162:129-130
19. **Fischbarg J, Hernandez J, Liebovitch LS, Koniarek JP (1985)**  
*The mechanism of fluid and electrolyte transport across corneal endothelium: critical revision and update of a model.*  
Curr Eye Res 4:351-360
20. **François J, Hollwich F**  
*Augenheilkunde in Klinik und Praxis*  
1. Auflage, Band 2, Thieme 1981;1.2-1.4
21. **Freddo TF, Leibowitz HM (1985)**  
*Bilateral acute corneal calcification.*  
Ophthalmology 92:537-542
22. **Galin MA, Obstbaum SA (1974)**  
*Band keratopathy in mercury exposure.*  
Ann Ophthalmol 6:1257-1261

23. **Golan A, Savir H, Bar-Meir S, Oliver I, De Vries A (1975)**  
*Band keratopathy due to hyperparathyroidism.*  
Ophthalmologica 171:119-122
24. **Haldiman C (1941)**  
*Hornhaut- und Bindehautveränderungen bei Boeckscher Krankheit.*  
Ophthalmologica 102:137-145
25. **Hanselmayer H, Poggitsch H, Schmidberger H (1974)**  
*Kalzifikation der Bindehaut und Hornhaut bei chronischer Niereninsuffizienz und Hämodialyse.*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 164:98-105
26. **Heiligenhaus A, Niewerth M, Mingels A, Ganser G, Thon A, Pleyer U, Greiner K, Minden K (2005)**  
*Epidemiologische Daten zur Uveitis bei juveniler idiopathischer Arthritis aus einer bundesweiten pädiatrischen und ophthalmologischen Datenerhebung.*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 222:993-1001
27. **Hesse L, Bodanowitz S (1997)**  
*Erfolge und Komplikationen der rTPA-Behandlung am vorderen Augenabschnitt. Kommentar zur Arbeit von K. U. Löffler et al.*  
Ophthalmologe 94:446-447
28. **Hesse L, Nebeling B, Kauffmann T (1999)**  
*Zur Ursache kornealer Trübungen nach Gewebeplasminogen-Aktivator-induzierter Fibrinolyse in der Vorderkammer.*  
Ophthalmologe 96:448-452

29. **Jaffe GJ, Abrams MD, Williams GA, Han DP (1990)**  
*Tissue plasminogen activator for postvitrectomy fibrin formation.*  
Ophthalmology 97:184-189
30. **Johnston RL, Stanford MR, Verma S, Green WT, Graham EM (1995)**  
*Resolution of calcific band keratopathy after lowering elevated serum calcium in a patient with sarcoidosis.*  
Br J Ophthalmol 79:1050
31. **Junqueira LC, Carneiro J**  
*Histologie*  
4. Auflage, Springer 1996;659-661
32. **Kanski JJ**  
*Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*  
2. Auflage, Thieme 1996;96
33. **Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, Waltman SR**  
*The cornea*  
New York: Churchill Livingstone 1989; 447
34. **Kennedy RE, Roca PD, Landers PH (1971)**  
*Atypical band keratopathy in glaucomatous patients.*  
Am J Ophthalmol 72:917-922
35. **Kinoshita JH (1962)**  
*Some aspects of carbohydrate metabolism of the cornea.*  
Invest Ophthalmol 1:178
36. **Klaassen-Broekema N, van Bijsterveld OP (1993)**  
*Limbal and corneal calcification in patients with chronic renal failure.*  
Br J Ophthalmol 77:569-571

37. **Krallmann R, Althaus C, Reinhard T, Sundmacher R (1995)**  
*Intraokulare Fibrinolyse mit rekombinantem Plasminogen-Aktivator nach Katarakt-Chirurgie.*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 206:21
38. **Lang GK**  
*Augenheilkunde*  
1. Ausgabe, Thieme 1998;119-122,435
39. **Lavid FJ, Herreras JM, Calonge M, Saornil MA, Aguirre C (1995)**  
*Calcareous corneal degeneration: Report of two cases.*  
Cornea 14:97-102
40. **Lemmen KD, Dimopoulos S, Kirchhof B, Heimann K (1987)**  
*Keratopathy following pars plana vitrectomy with silicone oil filling.*  
Dev Ophthalmol 13:88-98
41. **Lemp MA, Ralph RA (1977)**  
*Rapid development of band keratopathy in dry eyes.*  
Am J Ophthalmol 83:657-659
42. **Löffler KU, Funk J (1997)**  
*Antwort zum Leserbrief.*  
Ophthalmologie 94:447
43. **Löffler KU, Meyer JH, Wollensack G, Funk J (1997)**  
*Erfolge und Komplikationen der r-TPA-Behandlung am vorderen Augenabschnitt.*  
Ophthalmologie 94:50-52
44. **Naumann GOH**  
*Pathologie des Auges*  
Band 12, Thieme 1980;736



45. **Nevyas AS, Raber IM, Eagle Jr RC, Wallace IB, Nevyas HJ (1987)**  
*Acute band keratopathy following intracameral viscoat.*  
Arch Ophthalmol 105:958-964
46. **Obenauf CD, Shaw HE, Syndor CF, Klintworth GK (1978)**  
*Sarcoidosis and its ophthalmic manifestations.*  
Am J Ophthalmol 86:648-655
47. **Obenberger J, Cejková J, Brettschneider I (1970)**  
*Experimental corneal calcification. A study of acid mucopolysaccharides.*  
Ophthalmic Res 1:175-186
48. **Obenberger J, Ocumpaugh DE, Cubberly M (1969)**  
*Experimental corneal calcification in animals treated with dihydrotachysterol.*  
Invest Ophthalmol 8:467-474
49. **O'Connor GR (1972)**  
*Calcific band keratopathy.*  
Trans Am Ophthalmol Soc 70:58-81
50. **Ocumpaugh DE, Obenberger J (1970)**  
*Experimental corneal calcification.*  
Clin Orthop Rel Res 69:162-171
51. **Porter R, Crombie AL (1973)**  
*Corneal and conjunctival calcification in chronic renal failure.*  
Br J Ophthalmol 57:339-343
52. **Prasod Rao G, O'Brien C, Hicky-Dwyer M, Patterson A (1995)**  
*Rapid onset bilateral calcific band keratopathy associated with phosphate-containing steroid eye drops.*  
Eur J Implant Ref Surg 7:251-252

53. *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*  
257. Auflage, de Gruyter 1994;752
54. **Rehfeldt K, Hoh H (1999)**  
*Therapeutic and prophylactic application of TPA (recombinant tissue plasminogen activator) into the anterior chamber of the eye.*  
Ophthalmologe 96:587-593
55. **Sachsenweger M**  
*Augenheilkunde*  
1. Auflage, Hippokrates 1994;130,388-390
56. **Schlotzer-Schrehardt U, Zagorski Z, Holbach LM, Hofmann-Rummelt C, Naumann GO (1999)**  
*Corneal stromal calcification after topical steroidphosphate therapy.*  
Arch Ophthalmol 117:1414-1418
57. **Schmitz K, Greite JH, Bartenschlaeger EM (1995)**  
*Tissue plasminogen activator for the treatment of postoperative intraocular fibrinous membranes following cataract surgery.*  
Ger J Ophthalmol 4:75-79
58. **Schrage NF, Flick S, Redbrake C, Reim M (1996)**  
*Electrolytes in the cornea: a therapeutic challenge.*  
Graefes Arch Clin Exp Ohthalmol 234:761-764
59. **Schrage NF, Schlobetamacher B, Aschenbrenner W, Langefeld S (2001)**  
*Phosphate buffer in alkali eye burns as an inducer of experimental corneal calcification.*  
Burns 27(5):459-64

60. **Selye H (1962)**  
*The dermatologic implications of stress and calciphylaxis.*  
J Invest Derm 39:259-275
61. **Severin M, Bulla M (1979)**  
*Hornhautablagerungen bei Kindern mit Dialysebehandlung unter einer Therapie mit Vitamin D3 und 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol.*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 175:670-676
62. **Taravella MJ, Forstot SL (1991)**  
*Calcific band keratopathy.*  
Arch Ophthalmol 109:1072
63. **Taravella MJ, Stulting RD, Mader TH, Weisenthal RW, Forstot SL, Underwood L (1994)**  
*Calcific band keratopathy associated with the use of topical steroid-phosphate preparations.*  
Arch Ophthalmol 112:608-613
64. **Tennant MT, Borrillo JL, Regillo CD (2002)**  
*Management of submacular hemorrhage.*  
Ophthalmol Clin North Am 15:445-452
65. **Thall EH, Levine MR, Bruner WE, Sternberg I (1985)**  
*Band keratopathy after orbicularis extirpation for essential blepharospasm.*  
Arch Ophthalmol 103:475
66. **Trepel M**  
*Neuroanatomie*  
1. Auflage, Urban Schwarzenberg 1995;261

67. **Tripathi RC, Tripathi BJ, Park JK, Quaranta L, Steinsapir K, Lehman E, Ernest JT (1994)**  
*Intracameral tissue plasminogen activator for resolution of fibrin clots after glaucoma filtering procedures.*  
Am J Ophthalmol 111:247-248
68. **Ullman S, Lichtenstein SB, Heerlein (1986)**  
*Corneal opacities secondary to Viscoat.*  
J Cataract Refract Surg 12:489-492
69. **Weber U, Sons HU, Lenz W, Bernsmeier H (1986)**  
*Experimentally induced calcium oxalate keratopathy in rabbits.*  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224:447-451
70. **Wilson KS, Alexander S, Chrisholm IA (1982)**  
*Band keratopathy in hypercalcemia of myeloma.*  
Can Med Assoc J 126:1314
71. **Wollensack G, Meyer JH, Löffler KU, Funk J (1996)**  
*Bandförmige Keratopathie nach Behandlung der postoperativen Fibrinreaktion mit Gewebeplasminogenaktivator.*  
Klin Monatsbl Augenheilkd 209:43-46
72. **Zeeck A, Eick S, Krone B, Schröder K**  
*Chemie für Mediziner*  
2. Auflage, Urban Schwarzenberg 1992;86-87,110

## **7 Abbildungen und Tabellen**

- Abb. 1.1 Mikrophotographie von einem Querschnitt durch die Kornea  
(Vergrößerung x 80)  
aus Junqueira LC, Carneiro J  
Histologie  
4. Auflage, Springer 1996;659
- Abb. 1.2 Anatomie der Hornhaut  
aus Kanski JJ  
Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie  
2. Auflage, Thieme 1996;96
- Tabelle 1.1 Hornhauttrübungen  
aus Augustin AJ  
Augenheilkunde  
2. Ausgabe, Springer 2001;846-847
- Tabelle 1.2 Ringförmige Veränderungen der peripheren Hornhaut  
aus Augustin AJ  
Augenheilkunde  
2. Ausgabe, Springer 2001;847
- Abb. 1.3 Bandförmige Keratopathie  
aus Kanski JJ  
Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie  
2. Auflage, Thieme 1996
- Tabelle 2.1 Behandlungsgruppen
- Abb. 2.1 Endothelinzisionen
- Abb. 2.2 Überwiegend diffuse Trübung
- Abb. 2.3 Überwiegend schollige Trübung
- Tabelle 2.2 Chemikalien in den einzelnen Kammern des Gewebeeinbettautomaten mit  
durchschnittlicher Verweildauer der Präparate
- Tabelle 3.1 Korneale Veränderungen bei Augen mit Endothelinzision nach 1 Monat
- Tabelle 3.2 Übersicht der Hornhautveränderungen bei Augen mit Endothelinzision  
nach Ablauf eines Monats

- Tabelle 3.3 Hornhauttrübungen jedweder Art bei Augen mit Endothelinzision
- Tabelle 3.4 Korneale Veränderungen bei Augen ohne Endothelinzision nach 1 Monat
- Tabelle 3.5 Übersicht der Hornhautveränderungen bei Augen ohne Endothelinzision nach Ablauf eines Monats
- Tabelle 3.6 Hornhauttrübungen jedweder Art bei Augen ohne Endothelinzision
- Tabelle 3.7 Kontrollgruppe nach 1 Monat
- Abb. 3.1 Subepitheliale Kalzifizierung mit Beteiligung der oberen Stromalamellen (von Kossa-Färbung, Vergrößerung x 400)
- Abb. 3.2 Epitheliale und subepitheliale Kalzifizierungen (von Kossa-Färbung, Vergrößerung x 200)
- Tabelle 3.8 Kalzium und Phosphatgehalt der verwendeten Medikamente im Vergleich zum Kammerwasser

## 8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Mein akademischer Lehrer war Herr Prof. Dr. med. Lutz Hesse in Marburg.

Darüber hinaus an der **Philipps-Universität Marburg** die Damen und Herren Professoren und Dozenten Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Berthold, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dodl, Effert, Elsässer, Feddersen, Feuser, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Goeke, Görg, Gotzen, Grau, Gressner, Grimm, Griss, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hasilik, Havemann, Heidenreich, Hellwig, Herzum, Hesterberg, Heubel, Heufelder, Hilgermann, Hoffmann, Höltermann, Joseph, Junge, Kaffarnick, Kälble, Kern, Kim-Berger, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kulkens, Kummer, Lammel, Lange, Lauer, Lemke, Lennartz, Leonhardt, Leppek, Lippert, Löser, Lorenz, Maisch, Mannerz, Mannheim, Martin, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Niessing, Oertel, Peter, Pfab, Radsak, Ramaswamy, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schindler, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siegel, Slenzka, Sernal, Steiniger, Sturm, v. Wichert, Vohland, Voigt, Wagner, Weide, Weihe, Werner, Westermann, Zwioerek.

## **9 Danksagung**

Prof. Dr. med. Lutz Hesse danke ich für die Überlassung des Themas. Weiterhin danke ich Frau Wabeneg und Herrn Schmidt, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt Frau Seibert und Frau Damm aus dem histopathologischen Labor der Augenklinik der Philipps-Universität Marburg für Ihre große Hilfe bei der Aufarbeitung der histologischen Präparate. Meiner Tante Prof. Dr. Cornelia Behrens danke ich für Ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.